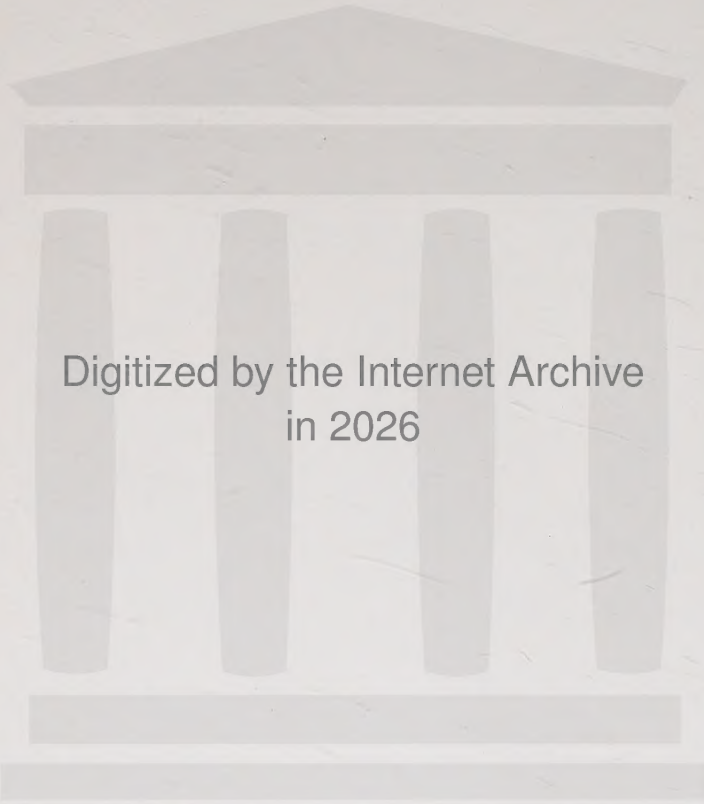


**Aktivierung und Kontrolle
der Herzmuskelkontraktion
auf zellulärer Ebene**

Rainer Bayer

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0092



Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

AKTIVIERUNG UND KONTROLLE DER HERZMUSKELKONTRAKTION
AUF ZELLULÄRE EBENE

Experimentelle Untersuchungen und Modell-
vorstellungen zur elektromechanischen Koppelung am
isolierten Warmblütermyokard

Habilitationsschrift

der

Hohen Medizinischen Fakultät der

Universität Düsseldorf

zur Erlangung der venia legendi

vorgelegt von

Rainer Bayer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 METHODEN	19
2.1 <u>Muskelpräparate</u>	19
2.3 <u>Lösungen</u>	19
2.3 <u>Registriereinrichtungen</u>	20
2.3.1 Voltage clamp-Untersuchungen	20
2.3.2 Mikroelektroden-Untersuchungen	22
2.3.3 Erfassung kontraktiler Phänomene	24
2.3.4 Der Analogrechner	29
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	31
3.1 <u>Die Potential-, Strom- und Zeitabhängigkeit der kontraktilen Aktivität. Voltage clamp-Untersuchungen am isolierten Warmblütermyokard</u>	31
3.1.1 Zur Existenz einer "sustained contracture" am Warmblütermyokard	31
3.1.2 Die mechanische Schwelle	34
3.1.3 Die Abhängigkeit der kontraktilen Aktivität vom Membranpotential (Potential-Kraftbeziehung)	38
3.1.4 Die Potential-Kraftbeziehung in Abhängigkeit von der Dauer der Membrandepolarisation (Potential-Kraft-Zeitbeziehung)	43
3.1.5 Die Erholung der kontraktilen Aktivität nach abgelaufener Kontraktion (Restitution)	50
3.2 <u>Formulierung eines Modells der elektromechanischen Koppelung des Warmblütermyokards auf der Basis von Calciumbewegungen. Programmierung der Calciumkinetiken auf einem Analogrechner</u>	56
3.2.1 Die physiologischen Postulate	60
3.2.2 Das Reaktionsschema und seine mathematische Formulierung	73
3.2.3 Die Programmierung des Computers	81
3.2.4 Die Einstellung des Analogmodells	85

	Seite
3.3 <u>Vergleich der kontraktilen Muster des Analogmodells mit dem Verhalten des lebenden Myokards</u>	90
3.3.1 Die Amplituden-Frequenzbeziehung und Treppenphänomene nach Wechsel der Reizfrequenz	90
3.3.2 Die postextrasystolische Potenzierung	94
3.3.3 Die Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen	96
3.3.4 Die Beziehung zwischen Erregung und Kontraktion	100
3.4 <u>Vergleich der inotropen Wirkmuster von Verapamil, D 600, Ni^{2+}, La^{3+} und partiellem Ca^{2+}-Entzug. Untersuchungen am isolierten Katzenpapillarmuskel</u>	106
3.4.1 Die Amplituden-Frequenzbeziehung und Treppenphänomene nach Wechsel der Reizfrequenz	108
3.4.2 Die Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen	112
3.4.3 Die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen	119
3.5 <u>Der Einfluss von Verapamil auf das elektrische Verhalten isolierter Katzenpapillarmuskeln</u>	126
3.5.1 Der langsame Einwärtsstrom	126
3.5.2 Das monophasische Aktionspotential	131
3.6 <u>Versuch einer Zuordnung der Effekte calcium-antagonistischer Massnahmen zu spezifischen Wirkorten. Einsatz des Analogmodells zur Wirkortanalyse</u>	136
4 SCHLUSSBEMERKUNG	143
5 ZUSAMMENFASSUNG	150
6 LITERATURVERZEICHNIS	155

1 E I N L E I T U N G

=====

Die elektromechanische Koppelung umfasst alle Prozesse an Muskelzellen, die mit der elektrischen Membranerregung beginnen und mit der Kontraktion enden. Seit den grundlegenden Beobachtungen von RINGER (1883) ist es allgemein anerkannt, dass die Fähigkeit des Myokards sich zu kontrahieren, nur dann erhalten bleibt, wenn eine genügende Menge Ca^{2+} im Perfusionsmedium vorhanden ist. Aus einer Vielzahl von experimentellen Ergebnissen wissen wir heute, dass die Calciumionen den zentralen Mechanismus der Kontraktionsauslösung kontrollieren, indem sie im Zusammenspiel mit den regulativen Proteinen des Troponin-Tropomyosinsystems die Interaktion von Aktin und Myosin ermöglichen. Aus der heutigen Sicht lässt sich daher die elektromechanische Koppelung am besten durch die Gesamtheit der zellulären und subzellulären Calciumbewegungen beschreiben, welche auf die eine oder andere Weise die Calciummenge bestimmen, die den kontraktilen Proteinen für die Kontraktion angeboten werden kann, und welche durch Wiederentfernen der Calciumionen von den regulativen Proteinen die Erschlaffung des Muskels ermöglichen.

Im Laufe der Zeit sind hierzu je nach Erkenntnisstand verschiedene Modellvorstellungen entwickelt worden. Ein sehr einfaches Modell der Calciumbewegungen im Rahmen der elektromechanischen Koppelung, die sogenannte " Ca^{2+} -Entry"-Theorie, basiert auf der Beobachtung, dass der rhythmisch aktivierte Herzmuskel im Vergleich zum ruhenden Myokard Calcium viel schneller aufnimmt (WINEGRAD und SHANES, 1962; LANGER und BRADY, 1963; NIEDERGERKE, 1963). Anhand ihrer Tracerfluxmessungen am isolierten Meerschweinchenvorhof kamen WINEGRAD und SHANES (1962) zur Auffassung, dass Ca^{2+} während der Erregung durch die Membran in die Myokardzelle gelangt, die kontraktilen Proteine durch Diffusion erreicht und akti-

viert. Darüberhinaus wurde postuliert, dass der Calciumeinstrom nicht nur Auslöser, sondern auch eine wichtige quantitative Determinante der myokardialen Kraftentwicklung ist.

Die " Ca^{2+} -Entry"-Theorie wurde anfänglich durch Ergebnisse aus elektrophysiologischen Untersuchungen gestützt. Unter sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen konnte nämlich gezeigt werden, dass sich die Kontraktionsamplitude in weiten Grenzen proportional zur Dauer des auslösenden Aktionspotentials verhält (VAUGHAN-WILLIAMS, 1959; KAVALER, 1959; ANTONI, ENGSTFELD und FLECKENSTEIN, 1962; KAUFMANN und FLECKENSTEIN, 1965). Aus diesen Ergebnissen ging deutlich hervor, dass das Aktionspotential beim Herzmuskel im Gegensatz zum Skelettmuskel nicht nur als Auslöser für die Kontraktion dient, sondern die Gipfelspannung und den zeitlichen Verlauf der Kontraktion weitgehend mitbestimmt. Es wurde also angenommen, dass die Dauer des Aktionspotentials den transmembranären Calciuminflux reguliert, der dann seinerseits das Ausmass der kontraktilen Aktivierung bestimmt.

Diese Modellvorstellung liess sich im Laufe der Jahre nicht ohne Einschränkungen aufrechterhalten: Anhand sorgfältiger Messungen und Berechnungen konnte nachgewiesen werden, dass die Calciummenge, die während eines einzelnen Aktionspotentials in die Zelle gelangt, viel zu gering ist, um eine Kontraktion von ausreichender Amplitude auszulösen. Daneben gab es auch Befunde aus elektrophysiologischen Untersuchungen, die nicht mit der " Ca^{2+} -Entry"-Theorie in Einklang zu bringen waren. Ihre Ergebnisse, die sie nach Veränderung der Aktionspotentialdauer (Gleichstromapplikation über eine Saccharosetrennwand) erhielten, interpretierten MOPAD und TRAUTWEIN (1968) dahingehend, dass das Aktionspotential keinen entscheidenden Einfluss auf die Amplitude der Kontraktion besitzt. Selbst Aktionspotentiale, die auf weniger als 1/10 ihrer normalen Dauer abgekürzt

wurden, lösten kontraktile Antworten aus, deren Gipfelspannung noch etwa 60-75 % der Kontrollwerte entsprach. Auch eine Verlängerung des Aktionspotentials auf der Höhe des Plateaus (Membranpotential -25 mV) führte zu keiner wesentlichen Veränderung der mechanischen Gipfelspannung oder von dp/dt . Die Resultate von MORAD und TRAUTWEIN (1968) schienen zunächst ein Indiz dafür zu sein, dass auch beim Herzmuskel, ähnlich wie beim Skelettmuskel, dem Aktionspotential mehr die Funktion eines Auslösers als die eines steuernden Parameters für die Kontraktion zukommt. Die " Ca^{2+} -Entry"-Theorie schien vorerst widerlegt.

Kurze Zeit später konnte jedoch durch die umfangreichen Untersuchungen der Arbeitsgruppen ANTONI, JAKOB und KAUFMANN (1969) und WOOD, HEPPNER und WEIDMANN (1969) am isolierten Kalt- und Warmblütermyokard nachgewiesen werden, dass die Dauer des monophasischen Aktionspotentials die kontraktile Lage des Myokards zumindest mittel- bis langfristig steuert. In Übereinstimmung zu den Resultaten von MORAD und TRAUTWEIN (1968) bestätigten beide Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass Veränderungen der Aktionspotentialdauer keinen wesentlichen Einfluss auf die Amplitude der gleichzeitig ausgelösten Kontraktion haben. Bei rhythmischer Aktivierung des Warmblütermyokards stellte sich aber heraus, dass eine einmalige Änderung der Aktionspotentialdauer erst im Verlauf der nachfolgenden Kontraktionen eine Änderung der mechanischen Antwort herbeiführt. Besonders deutlich stellte sich die Abhängigkeit der Kontraktionsamplitude von der Aktionspotentialdauer dann dar, wenn die Verlängerung bzw. Verkürzung des Aktionspotentials in einem rhythmisch aktivierten Katzenpapillarmuskel für längere Zeit beibehalten wurde. Mit dem Einsetzen der Veränderung der Aktionspotentialdauer kam es entweder zu einem treppenförmigen Anstieg (bei Verlängerung des Aktionspotentials durch kathodische Polarisierung) oder Abfall (bei Ver-

kürzung des Aktionspotentials durch anodische Polarisation) der Kontraktionsamplituden. Nach etwa 6-8 Schlägen wurde jeweils ein neues Gleichgewicht erreicht.

Diese Ergebnisse stützten einerseits die sogenannte "Ca²⁺-Entry"-Theorie, indem sie bestätigten, dass unter Gleichgewichtsbedingungen die kontraktile Lage des Myokards deutlich von der Dauer des monophasischen Aktionspotentials abhängt. Andererseits zeigten diese Experimente aber auch, dass das Aktionspotential des Warmblütermyokards nicht in der Lage ist, die Kontraktionsamplitude direkt zu steuern. Vielmehr wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die erregungsbedingte transmembranäre Calciumversorgung des Warmblütermyokards offensichtlich erst über einen zeitintegrierenden Schritt Ausmass und Geschwindigkeit der mechanischen Antwort kontrolliert.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen am Katzenpapillarmuskel stellt sich am Froschmyokard die kontraktile Lage bei Veränderung der Aktionspotentialdauer sofort ein. Hier ist also ein solcher zeitintegrierender Schritt im Rahmen der elektromechanischen Koppelungsprozesse nicht vorhanden (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969). Das unterschiedliche mechanische Verhalten des Froschmyokards gegenüber dem Säugetiermyokard kann nur aus einer Verschiedenheit der elektromechanischen Koppelungsprozesse erklärt werden. Wichtige Anhaltspunkte für diese Vorstellung ergeben sich schon aus dem Vergleich der mittleren Zelldurchmesser beider Myokardgewebe. Der kleine Durchmesser der Froschmyokardzelle (2-8 μ) gestattet offenbar eine direkte Kontrolle der kontraktilen Aktivierung durch das Aktionspotential. Im Hinblick auf die Kopplung der Kontraktion an den Erregungsvorgang werden hier wegen der kurzen Diffusionsstrecke von der Oberflächenmembran zu den kontraktilen Elementen ein spezielles Zuleitungssystem und/oder intrazelluläre Calciumspeicher entbehrlich. Allem Anschein nach genügt im Froschmyokard ein vermehrter transmembranärer Calciumeinstrom während des Aktionspotentials

oder eine Freisetzung von Calciumionen von der Zellmembran ins Zellinnere, um das kontraktile System zu aktivieren.

Auch bei der relativ grossen Warmblütermyokardzelle (Durchmesser 8-40 μ) ist im Prinzip eine kontraktile Aktivierung durch membranär einströmendes oder direkt aus der Membran stammendes Aktivatorcalcium möglich. Entsprechend der von HILL (1948) angegebenen Gleichung für die Calciumdiffusion in einem Zylinder würde auch hier schon nach ca. 20 msec 90 % des Aktivatorcalciums das Zellzentrum erreicht haben, lange bevor der active state sein Maximum erreicht (MORAD und GOLDMAN, 1973).

Allerdings muss beim Warmblütermyokard angenommen werden, dass die Calciummenge, die während der Membranerregung in die Zelle einströmt sehr gering ist. WINEGRAD (1961; WINEGRAD und SHANES, 1962) schätzte, dass im günstigsten Fall pro Erregung nur $0.6 - 0.9 \times 10^{-12}$ M $\text{Ca}^{2+}/\text{cm}^2$ ins Faserinnere übertreten. Trotz des geringen Faserdurchmessers und des daraus resultierenden günstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses kann die Aktin-Myosin Interaktion daher nur zu einem sehr geringen Teil (2-3%) durch den erregungsbedingten Calciumeinstrom getragen werden. Zur vollen Aktivierung ihres kontraktile Apparates bedarf die Warmblütermyokardzelle offenbar intrazellulärer Calciumdepots. Die aus intrazellulären Speichern verfügbare Menge an Aktivatorcalcium kontrolliert dann weitestgehend das Ausmass der kontraktile Aktivierung. Obwohl der Beitrag der transmembranären Calciumversorgung zur Aktivierung einer einzelnen Kontraktion sehr gering ist, vermag der erregungsbedingte Calciumeinwärtsstrom den Füllungszustand der intrazellulären Calciumspeicher mittel- bis langfristig zu verändern und damit die kontraktile Lage zu modifizieren (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969).

Aus heutiger Sicht muss daher das ursprüngliche Konzept der "Ca²⁺-Entry"-Theorie wie folgt modifiziert werden:

Am Warmblütermyokard existieren mindestens zwei separate Quellen, die Aktivatorcalcium zur kontraktile Aktivierung zur Verfügung stellen:

- 1) Ein intrazellulärer Calciumspeicher und
- 2) das aus dem Extrazellulärraum bzw. aus der Oberflächenmembran stammende Calcium.

Die Frage nach den intrazellulär gelegenen Ca²⁺-speichern den Strukturen lässt sich am besten anhand der funktionellen und morphologischen Unterschiede zwischen Skelettmuskel und Herzmuskel aufzeigen. Schon lange bekannt ist der auffällige Unterschied in der Empfindlichkeit von Herz- und Skelettmuskulatur gegenüber Veränderungen der äusseren Calciumkonzentration. Während Skelettmuskelfasern beispielsweise auch im calciumfreien Milieu über lange Zeit kontraktionsfähig bleiben, reagiert das Myokard auf Calciumentzug innerhalb kurzer Zeit mit einer vollständigen Aufhebung der kontraktile Aktivität. Andererseits kann durch Erhöhung von (Ca²⁺)_o die Kontraktionskraft des Herzens um ein Mehrfaches gesteigert werden, während beim Skelettmuskel nur eine vergleichsweise sehr geringe positiv inotrope Wirkung eintritt. Offensichtlich ist also der Skelettmuskel von der transmembranären Calciumversorgung weitgehend unabhängig.

Aus den Untersuchungen von BIANCHI und SHANES (1959) ging bereits hervor, dass hier im Vergleich zum Warmblütermyokard während der Erregung nur ausserordentlich wenig Ca²⁺ in die Zelle einströmt. Zum anderen hatte bereits HILL (1948) darauf hingewiesen, dass am Skelettmuskel wegen des relativ grossen Faserdurchmessers (60-120 µ) das

schnelle Einsetzen des "active state" durch eine einfache Calciumdiffusion vom Extrazellulärraum zu den Myofibrillen nicht erklärt werden kann. Im Falle des Skelettmuskels war daher schon sehr früh klar, dass der " Ca^{2+} -Entry"-Mechanismus nicht zutrifft. Es musste angenommen werden, dass der Skelettmuskel den Typus eines quergestreiften Muskels repräsentiert, bei dem Aktivatorcalcium nahezu ausschliesslich aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird und das Aktionspotential lediglich das Signal zur Entleerung der Speicher übermittelt.

Als morphologisches Korrelat für die intrazellulären Calciumspeicher von Skelettmuskel und Warmblütermyokard wird heute allgemein das sarkoplasmatische Retikulum (SR) angesehen¹⁾. Obwohl seine Existenz und - in groben Zügen - auch seine Struktur durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BENNET und PORTER seit 1953 bekannt war, wurde die Bedeu-

¹⁾ Das SR des Skelettmuskels und des Warmblütermyokards besteht aus einem rein intrazellulär gelegenen, longitudinal ausgerichteten Membransystem. Als feines tubuläres Netzwerk (Retikulum) umhüllt es die Myofibrillen. In Höhe der transversalen Tubuli (siehe Fussnote Seite 9) erweitert sich das SR zu Zisternen (laterale=terminale Zisternen). Das transversale tubuläre System (TTS) und die beiden jeweils benachbarten lateralen Zisternen des SR bilden in Höhe der Z-Linie (Kaltblüterskelettmuskel, Warmblütermyokard) bzw. im Bereich des Übergangs zwischen A-I Banden (Warmblüterskelettmuskeln) sogenannte Triaden. Im Bereich dieser Strukturen legen sich die Membranen des longitudinalen Systems (SR) synapsenartig an die Wände der transversalen Tubuli an. Im Vergleich zum Skelettmuskel ist das SR des Warmblütermyokards wenig stark ausgeprägt; jedoch scheint beim Warmblütermyokard das Oberflächen/Volumen-Verhältnis grösser zu sein. Darüberhinaus ist das Volumen der lateralen Zisternen in der Warmblütermyokardzelle relativ klein. Allerdings finden sich beim Warmblütermyokard terminale Zisternen nicht nur im Bereich der transversalen Tubuli, sondern auch direkt unter der äusseren Zellmembran. Diese "subsarcolemmalen sacs" sind durch tubuläre Strukturen mit dem longitudinal verlaufenden SR verbunden. Die Ventrikelmyokardzelle des Kaltblüters und Skelettmuskelfasern von Typ der "slow muscle fibres", die über kein TTS verfügen, haben dagegen nur ein äusserst spärlich entwickeltes SR (SOMMER und JOHNSON, 1968; FAWCETT und McNUTT, 1969; FRANZINI-ARMSTRONG, 1973; PAGE und FOZ-ZARD, 1973).

tung des SR im Rahmen des Kontraktions-Relaxationszyklus erst Anfang der sechziger Jahre durch die Untersuchungen von HASSELBACH und MAKINOSE (1961), EBASHI (1961) und EBASHI und LIPMANN (1962) erkannt. Beide Arbeitsgruppen wiesen unabhängig voneinander nach, dass die sogenannten Erschlaffungsgrana (MARSH, 1952) (aus Muskelhomogenaten isolierte Vesikel des SR; EBASHI und LIPMANN, 1962) aktiv Calcium zu akkumulieren vermögen. Auf Grund der in vitro bestimmten Ca^{2+} -Bindungskinetiken liess sich berechnen, dass die Geschwindigkeit der Calciumaufnahme in die isolierten Vesikel des SR in etwa mit der Relaxationsgeschwindigkeit des Muskels in vivo übereinstimmte (HASSELBACH und MAKINOSE, 1963; OMSHI und EBASHI, 1964; WEBER, HERZ und REISS, 1966; zusammenfassende Darstellung WEBER, 1971a). Sorgfältige Abschätzungen machten deutlich, dass im SR der Skelettmuskel-, aber auch der Warmblütermyokardzelle, mehr Calcium gespeichert ist, als für eine volle kontraktile Aktivierung der Myofibrillen benötigt wird (WEBER, HERZ und REISS, 1964, 1967; KATZ, 1973; SOLARO und BRIGGS, 1974).

Bis heute ist der Mechanismus, welcher der Freisetzung von Aktivatorcalcium aus dem SR zugrunde liegt, nicht aufgeklärt. Es konnte zwar unter verschiedenen Versuchsbedingungen (z.B. Applikation von Coffein) gezeigt werden, dass isolierte Vesikel des SR einmal aufgenommenes Ca^{2+} wieder freisetzen können (WEBER, und HERZ, 1968; WEBER, 1968), jedoch ist es bis heute nicht gelungen, an isolierten Vesikeln die physiologischerweise sehr schnelle Freisetzung von Ca^{2+} nachzuahmen. Dies liegt daran, dass das auslösende Moment zur Calciumfreisetzung, nämlich das Aktionspotential, bei in vitro-Versuchen nicht simuliert werden kann. Seit den in vivo-Untersuchungen von JÖBSIS und O'CONNOR (1966) ist lediglich bekannt, dass die Calciumfreisetzung aus dem SR unmittelbar (innerhalb von 5 msec) nach Stimulation des Muskels erfolgt. Damit stellt sich die Frage, wie die elektri-

sche Erregung der äusseren Zellmembran, die offensichtlich die Calciumfreisetzung aus dem SR initiiert, ins Zellinnere übertragen wird.

1959 beschrieb ANDERSSON-CEDERGREEN am Skelettmuskel der Maus erstmals ein transversales tubuläres System (TTS), das - ausgehend von der äusseren Zellmembran - bis tief ins Zellinnere verläuft. Schon auf Grund dieser morphologischen Gegebenheit¹⁾ wurde damals die Vermutung ausgesprochen, die transversalen Tubuli dienten als Zuleitungswege, über die sich die Membranerregung ins Zellinnere ausbreite. Diese Vorstellung wurde durch die Versuche von HUXLEY und TAYLOR (1958) unterstützt. Es gelang ihnen mit feinen Glaselektroden eng begrenzte Membranbezirke isolierter Froschmuskeln selektiv zu depolarisieren. Die lokalen Depolarisationen führten nur dann zur Verkürzung der darunter liegenden Sarkomere, wenn die Elektrode in der Nähe des Z-Streifens aufgesetzt wurde, nämlich dort, wo beim Kaltblüterskelettmuskel die äussere Plasmamembran ins TTS übergeht. In die gleiche Richtung deuteten Untersuchungen von GAGE und EISENBERG (1967). Diese Autoren detubulierten Skelettmuskelfasern durch Behandlung mit hypertonischem Glycerol und beobachteten, dass dann normale Aktionspotentiale nicht mehr in der Lage waren eine kontraktile Antwort auszulösen.

Ein weiterer Hinweis auf die "Zuleitungsfunktion" der transversalen Tubuli ergab sich aus vergleichenden morphologi-

¹⁾ Das TTS besteht aus Kanälchen, die zum Extrazellulärraum hin sich verengen, jedoch offen sind. Sie ziehen von der äusseren Plasmamembran ausgehend ins Faserinnere, wobei sich im allgemeinen eine regelmässige Zuordnung der einzelnen Tubuli zu den Z-Linien (Amphibien) oder dem Übergang zwischen A- und I-Banden (Warmblüter) findet. (Zusammenfassende Darstellung siehe FRANZINI-ARMSTRONG, 1973).

schen Untersuchungen an verschiedenen Muskelzellarten (PAGE, 1965). Das TTS findet sich nämlich nur bei solchen Fasertypen, deren Querdurchmesser oberhalb 1-3 μ liegt, und die auf eine schnelle elektromechanische Verknüpfung angewiesen sind ("twitch fibres"), d.h. bei Fasern, bei denen eine transmembranäre Calciumversorgung auf der Basis einer Diffusion nicht ausreichend oder schnell genug erfolgen könnte. "Slow muscle fibres" besitzen dagegen nur ein rudimentäres bzw. überhaupt kein TTS.

Auch am Ventrikelmyokard aller bis heute untersuchten Warmblüter wurde ein TTS gefunden¹⁾. Im Herzmuskel kaltblütiger Vertebraten konnte es dagegen nicht nachgewiesen werden. Auch hier ist die Tatsache interessant, dass bei niedrigen Wirbeltieren, die kein TTS besitzen, die Durchmesser der Ventrikelmyokardzellen im Vergleich zu denen des Warmblüters relativ klein sind.

Für das Warmblütermyokard ist bis heute die "Fortleitungsfunktion" des TTS nicht eindeutig experimentell gesichert. Der Versuch - entsprechend dem Vorgehen von HUXLEY und TAYLOR (1958) am Skelettmuskel (siehe oben) - durch lokale Depolarisation einzelne Sarkomere des Warmblütermyokards zur Kontraktion zu bringen, scheiterte (MÜLLER, 1966). Bei punktförmiger Depolarisation konnte hier (allerdings erst bei hoher Stromdichte) eine kontraktile Antwort ausgelöst werden, die sich über 3-5 Sarkomere erstreckte. Die beschriebenen Unterschiede sind eher morphologischer Natur; dennoch lässt sich daraus nicht notwendigerweise folgern, dass die

¹⁾ Das TTS des Warmblütermyokards zeigt bei dem Vergleich mit der "fast muscle fibre" des Skelettmuskels einige Unterschiede: Die Durchmesser der transversalen Tubuli sind hier etwa 5 mal grösser. Darüberhinaus scheinen sie sich häufig in Form longitudinal orientierter "transversaler" Tubuli fortzusetzen. (Zusammenfassende Darstellung FAWCETT und McNUTT, 1969; SOMMER und JOHNSON, 1968).

Funktionsweise des TTS bei der Warmblütermyokardzelle verschieden von der des Skelettmuskels sei. Wahrscheinlich beruht die nicht streng lokale Kontraktion bei punktförmiger Depolarisation der Warmblütermyokardzelle auf dem vergleichsweise geringen Zelldurchmesser, einem recht weitlumigen TTS und auf der Existenz einer longitudinal orientierten Komponente des TTS (MORAD und GOLDMAN, 1973). Obwohl also der direkte experimentelle Nachweis fehlt, ist man auf Grund dieser Überlegungen heute allgemein der Ansicht, dass das TTS auch beim Warmblütermyokard die Erregung ins Zellinnere fortleitet und dort Aktivator- Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzt.

Aufbauend auf dem bisher entwickelten Grundkonzept lassen sich heute an quergestreiften Muskelfasern drei Hauptvarianten der elektromechanischen Koppelung klassifizieren (siehe Abb. 1):

- 1) Bei der schnellen Skelettmuskelfaser wird die elektrische Membranerregung über das TTS ins Zellinnere geleitet. Dieser Impuls wird in der Höhe der Z-Linie eines jeden Sarkomers auf das SR übertragen. Das SR reagiert darauf mit der Freisetzung gespeicherten Calciums und zwar in einem Ausmass, das eine Aktivierung nahezu aller Querbrücken ermöglicht. Wegen der unmittelbaren Nähe des SR zu den Myofibrillen ist die Diffusionsstrecke für Ca^{2+} minimal, sodass die kontraktile Aktivierung sehr schnell erfolgen kann. Nach Repolarisation der äusseren Zellmembran wird Ca^{2+} aktiv in die Speicher des SR zurückgebunden. Dieser Prozess bestimmt im wesentlichen die Muskelrelaxation (Abb. 1A).
- 2) Die Ventrikelmyokardzellen des Kaltblüters können bei der kontraktile Aktivierung weder auf ein spezielles System zur Erregungsfortleitung ins Zellinnere (TTS) noch auf voluminöse intrazelluläre Speicher (SP) zurückgreifen. Während des langdauernden Aktionspotentials (ca. 600-900 msec bei 22°C) strömt vermehrt Ca^{2+} in die Zelle ein, bzw. wird Ca^{2+} aus membraneigenen Reservoirs ins Zellinnere freigesetzt. Die kurze Diffusionsstrecke von der äusseren Zellmembran bis zu den kontraktile

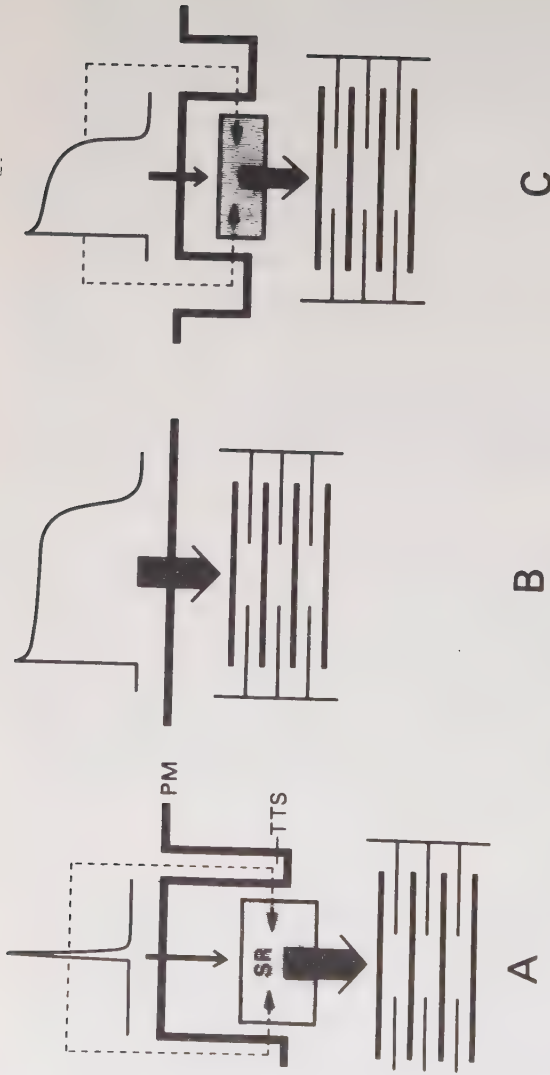


Abb. 1: Schematische Darstellung der prinzipiellen Unterschiede der elektromechanischen Koppelung an quergestreiften Muskeln. Beim Skelettmuskel (A) wird das Aktionspotential über das transversale tubuläre System (TTS) ins Zellinnere geleitet und bewirkt dort eine Freisetzung von Aktivatorcalcium aus den Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Das während des Aktionspotentials durch die Plasmamembran (PM) ins Zellinnere einströmende Ca^{2+} ist im Hinblick auf die kontraktile Aktivierung bedeutungslos. Im Gegensatz dazu wird beim Kaltblütermuskel (B) die kontraktile Aktivierung fast ausschließlich durch den erregungsbedingten Calciumeinwärtsstrom getragen. Das Warmblütermuskel (C) nimmt eine Zwischenstellung ein. Der größte Teil des Aktivatorcalciums wird - wie beim Skelettmuskel - bei Erregung aus dem SR freigesetzt. Das während der Erregung transmembranär einströmende Calcium trägt - wenn auch nur zu einem geringen Teil - zur kontraktilen Aktivierung bei.

Proteinen erlaubt dabei eine ausreichend schnelle kontraktile Aktivierung. Man muss annehmen, dass die Relaxation des Froschmyokards ebenfalls durch die Membran kontrolliert wird. Nach Repolarisation kann Ca^{2+} offensichtlich wieder in die Membran zurückgebunden bzw. wieder in den Extrazellulärraum transportiert werden (Abb. 1B).

- 3) Im Hinblick auf die elektromechanischen Koppelungsprozesse nimmt das Warmblütermyokard offensichtlich eine Zwitterstellung ein. Es verfügt einerseits über ein TTS und ein SR, die wie bei der schnellen Skelettmuskelfaser die Funktion der Erregungsleitung ins Zellinnere und der Ca^{2+} -Speicherung und -Freisetzung ausüben. Andererseits bedarf die Myokardzelle des Warmblüters wie die des Kaltblüters zur Aufrechterhaltung der kontraktilen Aktivität einer permanenten Calciumzufuhr aus dem Extrazellulärraum. Dies bedeutet: Auch beim Warmblütermyokard wird die Erregung über das TTS ins Zellinnere geleitet und dadurch intrazelluläres Speicher calcium aus dem SR ausgeschüttet. Eine Calciumaufsättigung der kontraktilen Fibrillen erfolgt hier jedoch gewöhnlich nicht. Die elektromechanische Kopplung ist daher "variabel" und hängt von der im SR-Depot verfügbaren Calciummenge ab. Der Füllungszustand seinerseits wird in erster Linie durch den erregungsbedingten transmembranären Calciumeinwärtsstrom bestimmt. Während des Aktionspotentials gelangt - wie beim Froschmyokard - eine nicht zu vernachlässigende Menge an Ca^{2+} in die Zelle. Die Menge dieses potentiellen Aktivator- Ca^{2+} ist allerdings im Vergleich zu der intrazellulär freigesetzten Menge klein, ihr unmittelbarer Beitrag zur jeweiligen Kontraktion gering. Bei repetitiver Aktivierung vermag die erregungsabhängige transmembranäre Calciumversorgung jedoch den Füllungszustand der intrazellulären Speicher und damit zeitintegrierend das Ausmass der kontraktilen Aktivität zu bestimmen (Abb. 1C).

Die Forderung nach einem erregungsabhängigen transmembranären Calciumeinwärtsstrom stand zunächst im Widerspruch zu der allgemeinen Annahme, dass auch an der Herzmuskelzelle - wie an der Nervenfaser - Natriumionen die einzigen Ladungsträger einwärtsgerichteter Ströme sind. Auf der Basis der Differentialgleichungen von HODGKIN und HUXLEY (1952), die den Verlauf des Aktionspotentials am Riesenaxon quantitativ durch die Potential- und Zeitabhängigkeit

der Membranleitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen beschreiben, konnte NOBLE (1960, 1962) durch geringfügige Modifikation der Gleichungen und Wahl anderer Konstanten typische Aktionspotentiale von Purkinje-Fasern berechnen. Die vergleichsweise lange Aktionspotentialdauer des Myokardgewebes wurde vor allem auf die anomale Gleichrichterwirkung¹⁾ der Myokardzellmembran (HUTTER und NOBLE, 1960) zurückgeführt und entsprechend im Rechenprogramm berücksichtigt.

Erste Versuche, die Membranströme am Warmblütermyokard direkt nachzuweisen wurden von WEIDMANN (1955) unternommen. Die Aussagekraft dieser ersten voltage clamp-Untersuchungen war jedoch gering, da es nicht gelang, das Membranpotential gleichmässig über die gesamte Membranoberfläche auf einem vorgegebenen Wert durch Strominjektion konstant zu halten (klemmen). Nach Verbesserung der voltage clamp-Methode (DECK, KERN und TRAUTWEIN, 1964) konnten KERN und TRAUTWEIN (1964) nachweisen, dass am Herzmuskel wie an der Nervenfasern die Kalium- und Natriumströme vom Membranpotential und der Zeit abhängen. Neben dem schnellen Natriumeinwärtsstrom wurde ein zweiter, langanhaltender (Zeitkonstante 100 msec) Einwärtsstrom gefunden, der zunächst ebenfalls als Natriumstrom gedeutet wurde. Die Dauer und der typische Verlauf des Aktionspotentialplateaus der Purkinjefaser wurde durch das Zusammenspiel des prolongierten "Natriumeinwärtsstroms" und des verzögerten Kaliumauswärtsstroms erklärt.

¹⁾ Gleichrichter sind Vorrichtungen, die einem Strom - in Abhängigkeit von der Flussrichtung - einen Widerstand entgegensetzen. Als normale Gleichrichtung bezeichnet man in der Elektrophysiologie die Fähigkeit einer Membran, auf Depolarisation mit einer Abnahme, auf Hyperpolarisation mit einer Zunahme des Membranwiderstandes zu antworten (z.B. Nervenzellmembran). Bei anormaler Gleichrichtung nimmt bei Depolarisation der Membranwiderstand zu, bei Hyperpolarisation ab.

Unter Benutzung der gleichen voltage clamp-Methode konnte kurze Zeit später REUTER (1966) nachweisen, dass der oben erwähnte zweite Einwärtsstrom in seiner Amplitude deutlich von der extrazellulären Calciumkonzentration abhing. Es wurde die Vermutung ausgesprochen, dass dieser Strom ein von Calciumionen getragener Strom ist. Durch umfangreiche Untersuchungen wurde dieser Befund von vielen Arbeitsgruppen bestätigt und ergänzt (REUTER, 1967; MASCHER und PEPER, 1969; ROUGIER, VASSORT, GARNIER, GARGOUIL und CORABOEUF, 1969; REUTER und BEELER, 1969; OCHI, 1970; BEELER und REUTER, 1970a,b; VITEK und TRAUTWEIN, 1971; NEW und TRAUTWEIN, 1972a; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972, 1973; GETTES und REUTER, 1974; KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLEP und HERDEY, 1975; SIMURDA, SIMURDA, BRAVENY und SUMBERA, 1976; zusammenfassende Darstellung siehe REUTER, 1973a).

Es kann deshalb heute als gesichert gelten, dass am Kalt- und Warmblüterm yokard neben dem schnellen Natriumeinwärtsstrom ein zweiter, langsamer Einwärtsstrom fließt. Der schnelle Einwärtsstrom bestimmt den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials, während der zweite, langsamere Einwärtsstrom die Dauer und Form des Aktionspotentialplateaus mitbeeinflusst. Die Ladungsträger dieses zweiten Einwärtsstroms sind normalerweise Calciumionen. Im Prinzip können aber auch Natriumionen Ladungsträger des langsamen Einwärtsstromes sein. In Natrium-freier Lösung ist dieser Strom ein reiner Calciumstrom, in Calcium-freier Lösung ein Natriumstrom. Es scheint daher richtiger, diesen Strom als "zweiten" oder - auf Grund seiner vergleichsweise langsamen Aktivierung und Inaktivierung - als "langsamen" Einwärtsstrom zu bezeichnen.

Die Leitfähigkeit der Myokardzellmembran für Na^+ und Ca^{2+} wird - wie man heute annimmt - durch unterschiedliche Membranstrukturen, einen schnellen Natriumkanal und einen langsamen (Calcium-) Kanal, gesteuert. Beide Einwärtsströme können nämlich durch bestimmte Substanzen selektiv gehemmt werden: Der schnelle Natriumstrom durch Tetrodotoxin, der langsame Einwärtsstrom durch Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und - mit Einschränkungen - durch organische Verbindungen wie Verapamil und D 600.

Die Entdeckung des potentialabhängigen Calciumeinwärtsstromes bestätigte endgültig die Befunde von WINEGRAD und SHANES (1963), NIERGERKE (1963) und LANGER und BRADY (1963), dass der tätige Herzmuskel mehr Calcium aufnimmt als der ruhende. Die Einführung der voltage clamp-Technik als elektrophysiologische Untersuchungsmethode am Myokard brachte nicht nur in dieser Hinsicht grosse Fortschritte. Die Aufklärung des Zusammenhanges zwischen den Parametern der elektrischen Erregung einerseits und der Kontraktion andererseits litt bis dahin unter der Tatsache, dass das Aktionspotential nicht unabhängig von der Kontraktion kontrolliert verändert werden konnte. Jede Intervention (Medikamente, Temperatur, Reizfrequenz) veränderte gleichzeitig die elektrischen und kontraktile Prozesse. Die ersten Versuche, unter Verwendung einer Saccharosetrennwand durch Gleichstromimpulse das Aktionspotential in seiner Dauer kontrolliert und selektiv zu verändern (KAVALER, 1959; ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969), ergaben zwar den Hinweis, dass die Kontraktionskraft des Herzens von der Dauer des Aktionspotentials abhängt, eine quantitative Analyse zwischen kontraktilem Verhalten und Membranpotential konnte mit dieser Methode jedoch nicht durchgeführt werden. Erst durch die voltage clamp-Technik,

die es gestattet, durch Strominjektion (über einen Rückkoppelungsverstärker) das Membranpotential auf jedem gewünschten Wert festzuhalten (klemmen), wurde das Membranpotential eine voll kontrollierbare Variable.

Obwohl bereits 1968 durch FOZZARD und HELLAM Untersuchungen dieser Art unternommen wurden, und bis heute eine grosse Zahl von Arbeiten zur Frage der Potentialabhängigkeit der Herzmuskelkontraktion publiziert worden sind, bestehen hinsichtlich vieler Teilergebnisse erhebliche Widersprüche. Das liegt zum Teil daran, dass diese Untersuchungen mit Hilfe unterschiedlicher voltage clamp-Techniken gewonnen wurden (z.B. Benutzung von zwei Mikroelektroden: FOZZARD und HELLAM (1968), GIBBONS und FOZZARD (1971, 1975a,b); der Doppelsaccharosetrennwand: LEOTY (1971, LEOTY und RAYMOND (1972)); der Hybridtechnik, Potentialmessung mittels Mikroelektrode und Stromapplikation über eine Saccharosetrennwand: BEELER und REUTER (1970c), MORAD und ORKAND, (1971, NEW und TRAUTWEIN (1972b)). Möglicherweise führte auch das Verwenden unterschiedlicher Myokardgewebe (Vorhofstreifen, Trabekeln, Papillarmuskeln, Purkinjefasern) verschiedener Spezies (Hund, Katze, Schaf, Frosch, Ochsenfrosch, Meerschweinchen) dazu, dass sich die gewonnenen Teilergebnisse nicht in ein klares Gesamtbild der elektromechanischen Koppelungsprozesse einordnen lassen.

In der vorliegenden Arbeit soll der Versuch unternommen werden, durch systematische voltage clamp-Untersuchungen am isolierten Ventrikelmyokard der Katze wenigstens für diese Spezies einen Gesamtüberblick über die Potential-, Strom- und Zeitabhängigkeit der kontraktilen Aktivität des Warmblütermyokards zu erhalten. Auf der Basis der voltage clamp Ergebnisse und neuerer, aus der Literatur verfügbarer Daten über transmembranäre und subzelluläre Calciumbewegungen, soll sodann ein Modell der elektromechanischen Koppelung

formuliert werden. Nach Programmierung der Modellvorstellung auf einem Analogcomputer in Form von Calciumkinetiken soll überprüft werden, inwieweit das kontraktile Verhaltensmuster des Analogmodells mit dem des lebenden Myokards unter physiologischen Bedingungen und unter Einwirkung von Pharmaka übereinstimmt.

Die vorgelegte Arbeit basiert auf bereits veröffentlichten Ergebnissen (TRITTHART, KAUFMANN, VOLKMER, BAYER und KRAUSE, 1973; KAUFMANN, BAYER, FÜPNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974; BAYER, HENNEKES, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975; BAYER, KALUSCHE, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975) und enthält darüberhinaus neue, noch nicht publizierte Befunde.

2 M E T H O D E N

2.1 MUSKELPRÄPARATE

Katzen beiderlei Geschlechts zwischen 1.5 und 2.5 kg wurden unter leichter Äthernarkose getötet, die Herzen möglichst schnell entnommen und in ein Präparierbad mit oxygenierter Tyrodelösung (30°C) überführt. Aus dem rechten Ventrikel wurden sodann Papillarmuskeln zwischen 6 und 10 mm Länge und 0.5 - 1.2 mm Durchmesser herauspräpariert und ins Versuchsbad transferiert. Bei der Präparation wurde sowohl ein Teil der Tricuspidalklappe als auch der Ventrikelwand belassen. So konnten ohne Gewebeschädigung die Präparate sowohl am isotonischen Hebel als auch am Krafttransducer befestigt werden. Grosser Wert wurde darauf gelegt, dass die Muskelpräparate über ihre gesamte Länge möglichst gleichförmig zylindrisch und ohne Verzweigung waren. Länge und Querschnitt wurden mit Hilfe eines optischen Eichgitters unmittelbar unterhalb der Präparate im Versuchsbad bestimmt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Muskeln mindestens 1 Stunde aequilibriert. Während dieser Zeit kontrahierten sich die Muskeln mit 30 Schlägen pro Minute gegen eine Vorbelastung von 0.7 p/mm². Es wurden nur solche Präparate für die Versuche verwandt, die nach der Aequilibrationsperiode eine stabile isometrische Gipfelspannung von mindestens 4 p/mm² bzw. eine isotone Verkürzungsamplitude von mindestens 20% ihrer Ausgangslänge erreichten.

2.2 LÖSUNGEN

Als Perfusionsmedium wurde Tyrodelösung folgender Zusammensetzung verwendet (mM): NaCl 136.9; KCl 2.68; NaHCO₃ 11.9; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.15; NaH₂PO₄ 0.42; Glucose 5.6. Um auch

Spuren von Schwermetallionen zu eliminieren, wurde nur doppelt destilliertes Wasser unter Zugabe von EDTA (2×10^{-5} M) benutzt. Während der Experimente wurde die Tyrodelösung mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) durchperlt. Der Gasfluss wurde mittels eines elektrischen pH-Meters so überwacht, dass ein pH-Wert von 7.39 ± 0.01 konstant gehalten wurde. Das übliche Puffersystem der Tyrodelösung ($NaHCO_3$, NaH_2PO_4 , Carbogen) wurde in den Experimenten, bei denen $LaCl_3$ der Lösung zugesetzt wurde, durch einen Hepes NaOH-Puffer ersetzt und die modifizierte Tyrodelösung mit reinem Sauerstoff durchperlt. Verapamil und D 600 wurden dem Perfusat aus einer täglich frisch angesetzten Stammlösung (2.5 mg/ml) zugesetzt. Die Medikamenteneffekte wurden jeweils nach Erreichen des Wirkgleichgewichtes untersucht.

2.3 REGISTRIEREINRICHTUNGEN UND VERSUCHSANORDNUNGEN

2.3.1 Voltage clamp-Untersuchungen

In der Abb. 2 sind das Muskelbad und die elektrische Schaltung schematisch dargestellt. Die Versuchsanordnung entsprach im Prinzip der von HAAS, KEPN und EINWÄCHTER (1970). Geeignete Muskelpräparate wurden durch horizontale Bohrungen (0.7 mm) in den Badwänden, die die Kompartimente (1), (2) und (3) unterteilen, gezogen. Die äusseren Badkompartimente (1) und (2) wurden mit isotoner KCl, das innere Kompartiment mit Tyrode perfundiert. Durch Saccharosezuflüsse (4), (5) wurde das Testkompartiment (0.5 - 0.8 mm breit) gegen die beiden KCl-Kompartimente elektrisch isoliert. Die Saccharose gelangte durch Kapillarbohrungen in den Badwänden zwischen den Kompartimenten zuerst an die Muskelteile, die sich in der horizontalen Bohrung befanden. Von hier strömte bei gut eingestelltem Tyrodezufluss die Saccharose in Form einer laminaren Strömung an den Rändern des Testkompartimentes ab.

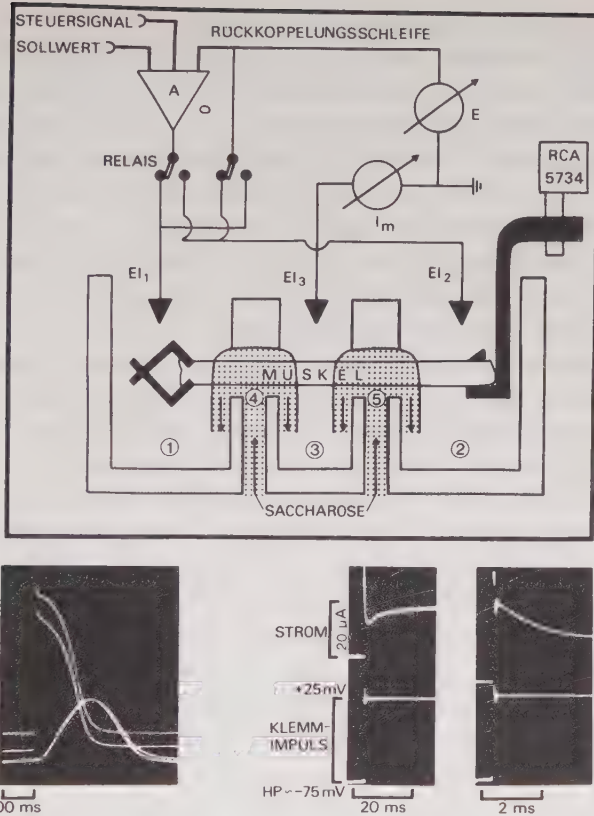


Abb. 2: Schematische Darstellung von Muskelbad und elektrischer Schaltung zu voltage clamp-Untersuchungen mit der Doppelsaccharosetrennwand: (1), (2) isotonische KCl; (3) Tyrode, Testkompartiment; (4), (5) laminare Saccharoseströmung zur elektrischen Isolierung; (El₁), (El₂) Stromzuführung aus dem Regelverstärker "A" und Spannungselektrode zur Messung des Membranpotentials "E"; (El₃) virtuelle Erde und Elektrode zur Messung von " I_m "; (PCA 5743) Röhrentransducer zur Messung der mechanischen Spannungsentwicklung. Originalregistrierungen von Aktionspotentialen (unten links), erhalten durch Messung der Potentialdifferenz zwischen (El₁) und (El₃), bzw. zwischen (El₂) und (El₃). Aus den Registrierungen, aufgezeichnet bei hoher Zeitablenkung des Kathodenstrahls (unten rechts), geht hervor, dass mit dem benutzten Messsystem eine stabile Kontrolle des Membranpotentials innerhalb von ca. 250 μ sec möglich ist.

Die Elektroden (Spannungselektrode, Elektrode für Stromzuführung, virtuelle Erde bzw. Elektrode zur Messung von I_m) waren Ag/AgCl-Agar Halbelemente. Sie wurden für jedes Experiment frisch hergestellt und in den Boden der jeweiligen Kompartimente eingeschraubt. Eine Relaischaltung ermöglichte ein Vertauschen der Elektroden (El_1 , El_2) in den KCl-Pools. Auf diese Weise konnten beide Elektroden sowohl für Potentialmessung als auch für Strominjektion verwendet werden. Darüberhinaus konnte durch diese Relaischaltung während des Experiments nachgeprüft werden, ob die Potential- und Widerstandsverhältnisse zwischen Testkompartiment und KCl-Kompartiment symmetrisch waren. Der Muskel wurde an einem Ende durch eine Klammer fest fixiert und mit seinen Klappenresten am Anodenstift des RCA-Transducers aufgehängt. Der Muskel wurde sodann gereizt und vorsichtig gedehnt bis ein Maximum der isometrischen Spannungsentwicklung eintrat. Experimente wurden nur dann ausgeführt, wenn durch Strominjektion in die KCl-Kompartimente (1), (2) gleichstarke Kontraktionen erzielt wurden. Weitere Voraussetzung für die Durchführung der Versuche war das Vorhandensein symmetrischer Widerstandsverhältnisse zwischen dem Testkompartiment und den KCl-Pools (siehe Originalregistrierungen der Abb. 1).

2.3.2 Mikroelektrodenableitungen

Die elektrische Registrierung des Erregungsablaufes erfolgte mit frei hängenden Mikroelektroden (nach LING und GERARD, 1949), welche in folgender Weise hergestellt wurden: Pyrexglasröhren (äusserer Durchmesser ca. 1.0 - 1.5 mm, lichte Weite von 0.8 - 1.3 mm) wurden mit Hilfe eines mechanischen Pullers zu Kapillaren ausgezogen, deren Spitzendurchmesser bei mikroskopischer Kontrolle unter 1μ lag. Das Füllen mit 3-molarer KCl-Lösung geschah in der Weise, dass die Kapillaren in ca. 80°C warme 3-molare KCl-Lösung eingetaucht und die Lösung durch Evakuieren (Wasserstrahlpumpe) zum Sieden

gebracht wurde. In der Regel füllten sich dabei die Kapillaren bis zur Spitze blasenfrei. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden aus den Kapillaren durch einen letzten Arbeitsgang verwendungsfähige Mikroelektroden hergestellt: Dazu wurde der Kapillarschaft ca. 20 mm von der Spitze entfernt angefeilt, vorsichtig abgebrochen und anschließend vom stumpfen Ende her mit 1%igem Tyrode-Agar bis etwa zur Hälfte ausgegossen. In den Agar wurde ein chloriertes Silberdrähtchen von 0.03 mm Dicke und ca. 30 mm Länge eingeführt und am Kapillarende durch einen schnell trocknenden Kunstharzlack mechanisch fixiert. Das andere Ende des Silberdrähtchens war bereits vorher mit einem Mikrostecker verlötet worden, an dem nun die fertige Elektrode frei hängend manipuliert werden konnte. Der elektrische Widerstand der so angefertigten Elektroden lag im Bereich zwischen 10 und 50 Megohm. Im allgemeinen kamen nur solche Elektroden zur Verwendung, deren Widerstand kleiner als 20 Megohm war.

Üblicherweise wurden die Elektroden am Arm eines Mikromanipulators frei hängend befestigt. Bei langsamer Senkung der Höhenverstellung stach sich dann die Elektrode durch ihr Eigengewicht in oberflächliche Zellen der Myokardpräparate ein. Die bewegliche Aufhängung ermöglichte das Arbeiten mit stark kontrahierenden Präparaten. Mit dieser Technik gelang es, zuweilen Einstiche bis über 1 Stunde aufrecht zu erhalten.

Als Bezugselektrode des Differenzverstärkers diente eine Ag/AgCl-Agar Elektrode. Die Impedanzanpassung der hochohmigen Elektrode an den Vorverstärker erfolgte wie üblich über eine Kathodenfolgerstufe, die Differenzierung der abgeleiteten Aktionspotentiale durch analoge Rechenelemente. Nach Vorverstärkung wurde der Verlauf von Aktionspotential und erster Ableitung des Aktionspotentials (dV/dt) über einen Zweistrahlsspeicheroszillographen registriert. Das Versuchsbad entsprach im Prinzip dem zur Erfassung kontraktiler Phänomene (siehe unten). Der Boden des Bades war

jedoch mit einer 2 mm dicken Plastikfolie belegt, in die sich dünne, rostfreie Stahlstiftchen zur Fixierung der Präparate einstecken liessen.

Die Muskeln wurden an genau definierter Stelle über eine bipolare Nadelelektrode elektrisch gereizt. Es wurden fünffach überschwellige Rechteckreize von 0.3 msec Dauer benutzt. Zur Vermeidung grosser Reizartefakte wurde das Reizsignal durch die Verwendung eines photoelektrischen Reizisolierers erdfrei gehalten.

2.3.4 Erfassung kontraktiler Phänomene

Die Abb. 3 gibt die von uns entwickelte umfangreiche Versuchsanordnung zur Messung kontraktiler Ereignisse des isolierten Myokards schematisch wieder (siehe auch KAUFMANN und BAYER, 1973; HENNEKES, KAUFMANN und STEINER, 1976). Das Versuchsbad war aus einem Plexiglasblock gefertigt, in den eine waagerechte Rinne von 40 x 5 x 5 mm eingefräst war. In der Umgebung des Muskels verengte sich das hydrodynamische Profil der Rinne auf 3 mm, um so die Flussgeschwindigkeit in unmittelbarer Nähe des Muskels stark zu erhöhen (Perfusionsvolumen 50 ml/min). Das Perfusat wurde durch eine Rollerpumpe rezirkuliert, wobei die Tyrodelösung zwei Wärmeaustauscher durchlief. Der erste Wärmeaustauscher brachte die Tyrodelösung unmittelbar vor dem Experimentierbad auf 32°C, der zweite kühlte sie wieder auf ca. 18°C ab. Die Reizung geschah über zwei muskelparallele Ag/AgCl-Flektroden mit fünffach schwellenwertigen Rechteckimpulsen von 0.3 msec Dauer.

Die Kraftmessung erfolgte mit Hilfe eines miniaturisierten Stathamtransducers MP 15 (micron Instr. Inc., Los Angeles) und eines Kraftübertragungshebels. Dieser Hebel aus rostfreiem Stahl hatte die Form eines grossen "L" mit einem langen (vertikalen) Schenkel von 25 mm und einem kurzen

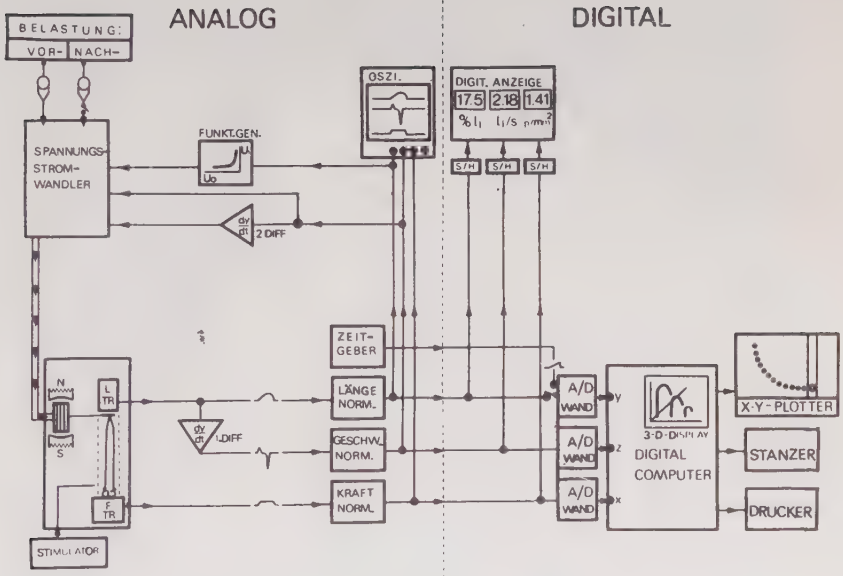


Abb. 3: Blockschaltbild der Versuchsanordnung zur Erfassung kontraktiler Ereignisse am Warmblütermyokard.

LTR = Längentransducer, berührungsloser Wegaufnehmer

FTR = Krafttransducer, Statham-Element

NS = Magnetfeld des Drehspulinstrumentes

S/H = Sample and Hold Schaltung

(horizontalen) Schenkel von ca. 8 mm Länge. Das freie Ende des langen Schenkels steckte in einer Achse und das (leicht gewölbte) "Knie" wurde mit einer justierbaren Feder gegen die druckempfindliche Fläche des Transducers gepresst. Die Spitze des kurzen Schenkels war zu einem Ring ausgebildet, dessen lichte Weite dem Muskelquerschnitt entsprach. Die vom Muskel entwickelte Kraft bzw. Kräfte aus dem elektromagnetischen Hebelsystem (siehe unten) verringerten den Federdruck auf den Transducer. Dieses System hatte eine sehr geringe Compliance (ca. $1 \mu\text{m/p}$) und eine Nullpunkt-drift von weniger als $\pm 0.1 \text{ p/h}$.

Als isotoner Muskelhebel diente ein Drehspulinstrument, dessen Rückholfeder entfernt wurde und dessen Zeiger durch ein ca. 30 mm langes hohles Aluminiumröhrchen ersetzt worden war. Die Spitze des Hebels war zu einer flachen Gabel ausgebildet, die rechtwinklig zur Zugrichtung des Muskels in das Muskelbad eintauchte. Das sehnige Ende des Präparates wurde mit einer starren Klammer an dieser Hebelspitze fixiert. Bei Gleichstromdurchfluss durch die Drehspule konnte an der Hebelspitze eine Ablenkkraft bis zu 10 p erzeugt werden. Gegen diese Kraft führte der Muskel seine Kontraktionen aus.

Die Äquivalentmasse der bewegten Teile betrug ungefähr 150 mg (errechnet aus der Hebelbeschleunigung bei einer gegebenen Kraft). Dämpfung durch Selbstinduktion wurde durch Aussteuerung mit einem Konstantstromgerät und durch eine freie, mit Harz umgossene Wicklung der Spule vermieden. Die Gesamtcompliance des elektromechanischen Hebelsystems betrug ungefähr $10 \mu\text{m/p}$.

Die Längenänderung des Muskels wurde über einen induktiven Wegaufnehmer (Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten) aufgenommen. Durch Annäherung oder Entfernung einer kleinen, auf dem isotonen Hebel befestigten, Aluminiumscheibe wird die Induktivität ($670 \mu\text{H}$) einer kleinen Spule, die Teil eines Oszillatorkreises ist, verändert und die so erzeugte Frequenzänderung des Oszillators in Gleichspannungsänderung

überführt. Das Ausgangssignal wurde elektronisch linearisiert; der Linearitätsfaktor betrug über 4 mm weniger als 1%.

Zur Steuerung der Muskelbelastung wurde ein Spannungs-Stromwandler verwendet, der - unabhängig vom Ausgangswiderstand - einen der Eingangsspannung proportionalen Strom liefert. Zur Festlegung der Vor- und Nachbelastung wurden dieser Steuereinheit variable Gleichspannungen zugeführt, die nach Spannungs-Stromwandlung wiederum spannungsproportionale Kräfte auf den Hebel (Zeiger) des Drehspulinstruments ausübten. Durch einen weiteren Eingang am Spannungs-Stromwandler bestand die Möglichkeit, zeit- und längenabhängig die Belastung zu variieren ("kontrollierter Release", Trägheitskompensation, Dämpfung).

Der elektromagnetische Hebel in Verbindung mit dem aktiven Muskel besitzt die Eigenschaften eines gedämpft schwingenden Systems (wegen der unvermeidbaren Äquivalentmasse der bewegten Teile in Serie mit der Muskelelastizität). Deshalb ist es wichtig, bremsende und beschleunigende Trägheitskräfte zu kompensieren (zu Beginn und am Ende einer Bewegung).

Die Trägheitskompensation wurde so verwirklicht, dass über Analogrechenverstärker die 1. und 2. Ableitung des Längensignals gebildet wurden. Die 2. Ableitung (= positive und negative Beschleunigung) wurde um 180° phasenverschoben auf den Steuerverstärker für den Spulenstrom (Spannungs-Stromwandler) zurückgeführt. Um jedoch auch für die eventuell nötige Dämpfung des Systems sorgen zu können, konnte auch die invertierte 1. Ableitung des Längensignals auf die Stromsteuerung zurückgekoppelt werden.

Um den Muskel während der isotonen Kontraktion kontrolliert entdehnen zu können ("kontrollierter Release"), wurde in einem Diodenfunktionsgenerator (Kaskade von 10 Dioden) ein elektronisches Analogon der Puhedehnungskurve des Muskels jeweils genau angeglichen. Während der Messung wurde dem Eingang des Funktionsgenerator das Verkürzungssignal des Muskels zugeführt. Das Ausgangssignal wurde nach Spannungs-

Stromwandlung auf das Drehspulinstrument geschaltet. Die Amplitude des Ausgangssignals konnte dann so eingestellt werden, dass die Belastung des Muskels jeweils um den richtigen Betrag (Rückstellkraft des parallel elastischen Elements) verringert wurde.

Es wurde angenommen, dass die Entlastung gemäss der Ruhedecknungskurve dann optimal angepasst war, wenn die Erschlaffung nach der isotonen Verkürzung zunehmend "unsicher" wurde. In der Praxis wurde das sogenannte "Unsicherheitskriterium" (HENNEKES, KAUFMANN und STEINER, 1977) zur Beurteilung der optimalen kontrollierten Entlastung herangezogen. Es ist klar, dass diese Methode - wie auch alle anderen - ihre eigenen Nachteile und Fehler besitzt, besonders wenn man berücksichtigt, dass die sogenannte Ruhe- (oder Parallel-) Elastizität ganz sicher dynamischen Veränderungen unterliegt.

Die analogen Signale von isometrischer Kraftentwicklung, Verkürzung und Verkürzungsgeschwindigkeit wurden über Analogrechenelemente entsprechend der geometrischen Daten des Muskels (Ausgangslänge, Querschnitt) normiert. Die Signalkalibrierung erfolgte so, dass eine Signalspannung von 1 V jeweils 1.0 p/mm^2 (Kraft), 10% der Standardausgangslänge L_1 (Verkürzung) oder $1 \text{ L}_1/\text{sec}$ (Verkürzungsgeschwindigkeit) entsprach. Abweichend von anderen Untersuchungen, in denen gewöhnlich Längenänderungen in Prozent von $l_{\max}$ oder l_0 ausgedrückt werden (beide entsprechen der Ausgangslänge beim Maximum der aktiven Längen-Spannungsbeziehung), normierten wir die Länge auf den Standard L_1 . Dieses L_1 war definiert als die Muskellänge, die der Muskel bei einer Vorbelastung von 0.7 p/mm^2 am Ende der Äquilibrierungsperiode einnahm. Praktisch ist dieses L_1 identisch mit $l_{\max}$ oder l_0 . Die normierten Analogsignale wurden fortlaufend auf einem 4-Kanalspeicheroszillographen und/oder einem 4 Kanaldirektschreiber aufgezeichnet. Zwei Digitalvoltmeter in Verbindung mit sogenannten "sample and hold"-Schaltungen erlaubten eine digitale Überwachung der maxi-

malen Verkürzungsgeschwindigkeit von Schlag zu Schlag. Ein drittes Digitalvoltmeter zeigte entweder Vorbelastung, Nachbelastung oder die Gesamtbelastung des Muskels an.

Die normierten analogen Kraft-Verkürzungs- und Verkürzungsgeschwindigkeitssignale wurden A/D gewandelt und auf ein 3-Kanaldigitalmemory (Tridac, Intertechnique) gegeben. Die hier gespeicherten Daten konnten entweder online dreidimensional auf einem Bildschirm zur Darstellung gebracht oder off-line auf einem XY-Drucker oder einem Schnelldrucker ausgegeben werden. Die Auflösung betrug 0.1 p/mm^2 auf der X-Achse, $0.5\% L_1$ (bzw. 5 ms) auf der Y-Achse und $0.05 L_1/\text{sec}$ auf der Z-Achse.

2.3.5 Der Analogrechner

Der Analogrechner (Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten), der von uns zur Aufstellung eines Modells der elektromechanischen Koppelung des Herzens verwendet wurde, besitzt folgende Bauelemente:

- 1) 32 Summierer
- 2) 16 Multiplizierer
- 3) 32 Integrierer
- 4) 32 Koeffizienten Potentiometer und darüberhinaus
- 5) 8 Funktionsgeneratoren zur Programmierung stetiger Übergangsfunktionen und
- 6) Komperatoren, mit Hilfe derer logische Entscheidungen getroffen und Schwell- bzw. Begrenzungswerte eingestellt werden können.

Die Recheneinheit "1" des HSE-Analogrechners beträgt 10 V. Sie ist gleichzeitig auch der grösstmögliche Rechenwert. Wird an irgendeiner Stelle eines im Ablauf befindlichen Programms diese Recheneinheit überschritten, so wird dies durch eine akustische und optische Übersteuerungsanzeige

gemeldet. Der Rechenfehler der einzelnen Bauelemente beträgt bis 1% der Einheitsspannung (10 V). Die Fehlerspannung ist im wesentlichen durch kleine Offsetspannungen der elektronischen Verstärker bedingt; sie können allerdings durch Multiplikation oder Integration sehr gross werden. Daher wurde bei der Programmierung darauf geachtet, dass die Eingabespannungen nicht zu klein gewählt wurden. War dies nicht möglich, so wurde die Offsetspannung durch eine Gegenspannung kompensiert. Es erwies sich als zweckmässig, bei dieser Fehlerkompensation die Potentiometer ohne Impedanzwandler zu benutzen, damit nicht erneut ein Fehler durch die Offsetspannung des Impedanzwandlers entstand.

Die Beschaltung des Computers geschah in üblicher Weise mittels externer Verkabelung auf einem Programmierfeld. Die Eingangsgrösse potentialabhängiger Koeffizienten wurde durch einen externen Rechteckgenerator bzw. durch einen Aktionspotential-Generator erzeugt. Die Aktionspotentiale wurden dabei in einem zweiten festverkabelten Analogmodell (KRAUSE, ANTONI und FLECKENSTEIN, 1966) - basierend auf den charakteristischen Strom-Spannungsbeziehungen der Myokardmembran - nachgebildet. Die Darstellung der Eingangs- und Ausgangsgrössen erfolgte auf einer vierkanaligen Speicheroszillographen und/oder einem mehrkanaligen Direkt-schreiber.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION =====

3.1 DIE POTENTIAL-, STROM- UND ZEITABHÄNGIGKEIT DER KON- TRAKTILEN AKTIVITÄT. VOLTAGE CLAMP-UNTERSUCHUNGEN AM ISOLIERTEN WARMBLÜTERMYOKARD

3.1.1 Zur Existenz einer "sustained contracture" am Warm- blüterm yokard

Bei voltage clamp-Untersuchungen muss das Testkompartiment kleiner als die Längskonstante der verwendeten Präparate gehalten werden¹⁾. Diese beträgt beim Warmblüterm yokard ungefähr 1.0 - 1.5 mm. Isolierte Herzmuskelpräparate (Papillarmuskeln, Trabekel von Katzen) sind in der Regel 5 - 6 mm lang; dementsprechend müssen die Abschnitte der Präparate, die sich nicht im Testkompartiment befinden, elektrisch und mechanisch inaktiviert werden. Nur so ist sichergestellt, dass die gemessene elektrische und mechanische Aktivität allein von dem Muskelabschnitt im Testkompartiment stammt. Diese "conditio sine qua non" wird bei der Anwendung der Doppel-Saccharosetrennwand nur durch längeres Auswaschen von Na^+ und Ca^{2+} erfüllt. Dabei zeigen gereizte Präparate nach Öffnen des Saccharosezuflusses - bedingt durch den Na-Entzug - anfänglich eine 3 bis 5fache Zunahme der isometrischen Gipfelspannung. Daneben treten Nachkontraktionen auf, die ebenfalls auf eine kontraktile Hyperaktivierung hindeu-

¹⁾ Die Längskonstante (λ) gibt an, in welcher Entfernung die Amplitude eines Impulses auf den e -ten Teil ($1/e = 0.37$) abgesunken ist. λ errechnet sich aus Membranwiderstand (r_m), innerem Längswiderstand (r_i) und äusserem Längswiderstand (r_o):

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{r_i + r_o}}$$

Bei einem grossen Tyrode (Test-) Kompartiment kommt es daher zu einer ungleichmässigen räumlichen Potentialverteilung (McGUIGAN, 1974).

ten (REITER, 1962; KAUFMANN und FLECKENSTEIN, 1965). In unseren voltage clamp-Untersuchungen wurde erst nach 10 bis 20 min ein Gleichgewichtszustand der phasischen Kontraktion erreicht, der dann für etwa eine weitere Stunde reproduzierbare Messungen erlaubte.

Die Abb. 4A zeigt eine Originalregistrierung von einem Experiment, bei dem absichtlich durch kurze Überflutung des Testkompartiments mit Saccharose eine kontraktile Hyperaktivierung erzeugt wurde. Unter dieser Versuchsbedingung wird eine Membrandepolarisation mit einer sehr hohen phasischen Kontraktion beantwortet, die in eine tonische Kontraktion übergeht ("sustained contracture"). In dieser Situation wird durch schnelle Repolarisierung der Membran regelmäßig eine zweite sehr hohe phasischen Antwort ausgelöst.

Die kontraktile Hyperaktivität konnte durch nachfolgende Perfusion des Testkompartiments mit reiner Tyrodelösung völlig beseitigt werden (Abb. 4B). Lediglich die repolarisationsbedingte phasische zweite Antwort (siehe dazu auch BEELE und REUTER, 1970c) wurde weiterhin - wenn auch mit sehr geringer Amplitude - unter folgender Voraussetzung ausgelöst: Das Membranpotential musste zuerst durch einen Klemmschritt auf einem recht hohen Potential festgehalten werden ($> +20$ mV), bevor es dann auf das Haltepotential (-75 mV) zurückgeklammert wurde.

Es fällt auf, dass bei Untersuchungen am Warmblütermyokard ausgeprägte "sustained contractures" nur in den Fällen beschrieben wurden, bei denen eine Saccharosetrennwand-Technik benutzt wurde. Wir sind der Meinung, dass "sustained contractures", die unter dieser Versuchsbedingung durch Verlängerung des Aktionspotentials mit Hilfe von Gleichstromimpulsen bzw. bei voltage clamp-Experimenten auftraten (KAVALER, 1959; MORAD und TRAUTWEIN, 1961; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969; OCHI und TRAUTWEIN, 1968; NEW und TRAUTWEIN, 1972b; MORAD und GOLDMAN, 1973) einem nur unvollstän-

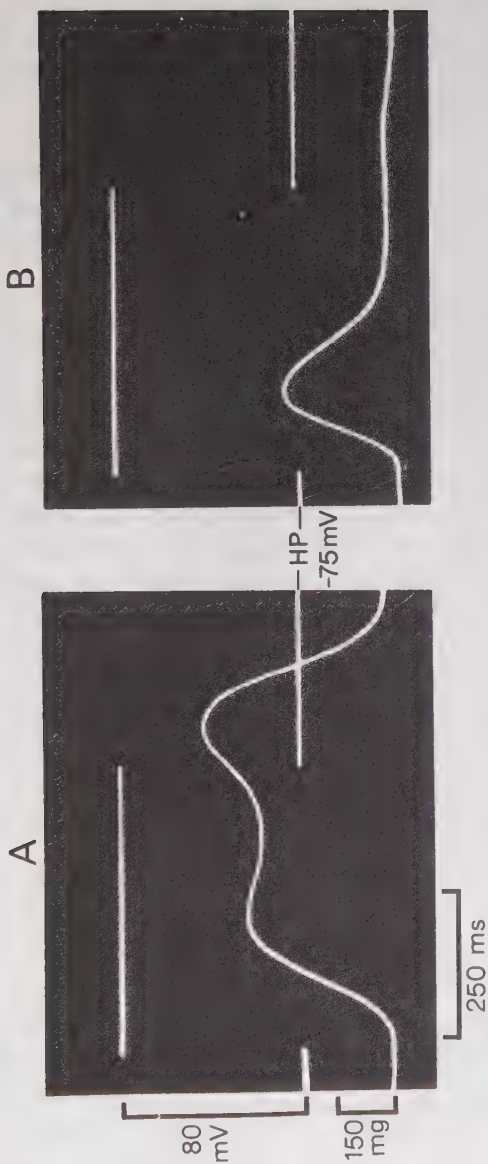


Abb. 4: Erzeugung einer "sustained contracture" durch kurze Überflutung des Testkompartimentes mit Saccharose (Bildteil A). Durch den repolarisierenden Klemmschritt wird eine zweite phasische Antwort ausgelöst. Nach 10 bis 15-minütiger Durchströmung des Testkompartimentes mit reiner Tyrodelösung zeigt sich wieder das normale phasische Kontraktionsverhalten des isolierten Warmblütermyokards (Bildteil B).

digen Natriumentzug des Muskelteils in den Saccharose-Kompartimenten zuzuschreiben ist. Es erscheint daher recht zweifelhaft, ob Messergebnisse, die unter kontraktiver Hyperaktivierung erhalten wurden, die normale Potential- und Zeitabhängigkeit des Kontraktionsverhaltens des Warmblütermyokards widerspiegeln.

Aus der Abb. 4B geht weiterhin hervor, dass die Relaxation des isolierten Katzenpapillarmuskels auch dann eintritt, wenn die Membran noch durch einen Klemmimpuls depolarisiert ist. Selbst bei Klemmimpulsen von 1 - 2 Sekunden Dauer war bei unseren Untersuchungen die kontraktile Antwort immer phasisch, d.h. die Relaxation war selbst bei grossen Depolarisationsschritten (bis +50 mV) immer vollständig. Hinsichtlich der Beziehung zwischen kontraktiver Aktivierung und Klemmdauer können wir damit die prinzipiellen Unterschiede zwischen dem Myokard von Amphibien und Warmblütern bestätigen. Bekanntlich entwickelt das Amphibienmyokard bei Klemmimpulsen, die länger als 500 msec dauern eine kontraktile Antwort, die aus einem initialen phasischen und darauffolgenden tonischen Anteil besteht. Die tonische Kontraktion hält dabei so lange an, wie die Depolarisation dauert (GOTO, KIMOTO und KATO, 1971; MORAD und ORKAND, 1971; HAAS und KERN, 1971; MORAD und GOLDMAN, 1973; LEOTY und RAYMOND, 1973). Im Gegensatz dazu erschlafft das Warmblütermyokard wie bei einer normalen Kontraktion völlig (siehe auch BEELER und REUTER, 1970c; GIBBONS und FOZZARD, 1971, 1975).

3.1.2 Die mechanische Schwelle

Bei Depolarisation der Membran durch rechteckige Klemmschritte wurden phasische Kontraktionen bei einem wohldefinierten Membranpotential ausgelöst. Diese Kontraktionen

folgten der "Alles oder Nichts"-Regel, d.h. sie waren in ihrer Amplitude nicht graduierbar (siehe unten). Die Schwelle zur Auslösung dieser "Alles oder Nichts"-Kontraktionen lag bei einem Membranpotential, das um 9.4 ± 0.4 mV ($n = 33$) niedriger war als das Haltepotential von etwa -75 mV. Die gleichzeitige Messung der transmembranären Einwärtsströme offenbarte, dass die mechanische Schwelle mit der Schwelle zur Aktivierung des schnellen Natriumeinwärtsstromes (I_{Na}) identisch ist (siehe Abb. 5).

Die Beziehung zwischen I_{Na} und Kontraktionsauslösung wird besonders deutlich, wenn den isolierten Myokardpräparaten trapezförmige Klemmschritte aufgezwungen werden. Wie die Abb. 6 zeigt, kommt es bei abnehmender Steilheit der Depolarisation sowohl zu einer zunehmenden Verspätung des Natriumstromes als auch der mechanischen Antwort. Das für beide Parameter identische Schwellenpotential wird dabei in Richtung niedrigerer Membranpotentialwerte verschoben. Bei einer Depolarisationsgeschwindigkeit langsamer als 145 mV/sec löst der depolarisierende Klemmschritt weder den schnellen I_{Na} noch eine Kontraktion aus. Unter diesen Versuchsbedingungen waren selbst Depolarisationen bis zum O-Potential (oder noch geringfügig darüber hinaus) nicht in der Lage, eine elektrische oder kontraktile Antwort herbeizuführen. Auch Variation von $(Ca^{2+})_o$ zwischen 0.5 und 7.5 mM konnte weder das kritische Membranpotential zur Aktivierung des I_{Na} noch das zur Auslösung einer mechanischen Antwort verändern, es wurden lediglich die Kontraktionsamplituden in ihrer bekannten Abhängigkeit von $(Ca^{2+})_o$ verändert.

Die Ergebnisse zeigen, dass am isolierten Katzenpapillarmuskel eine wohldefinierte mechanische Schwelle existiert, bei der eine "Alles oder Nichts"-Antwort von recht beachtlicher Amplitude ausgelöst wird. Am Warmblütermyokard fällt die mechanische Schwelle offensichtlich mit dem Membran-

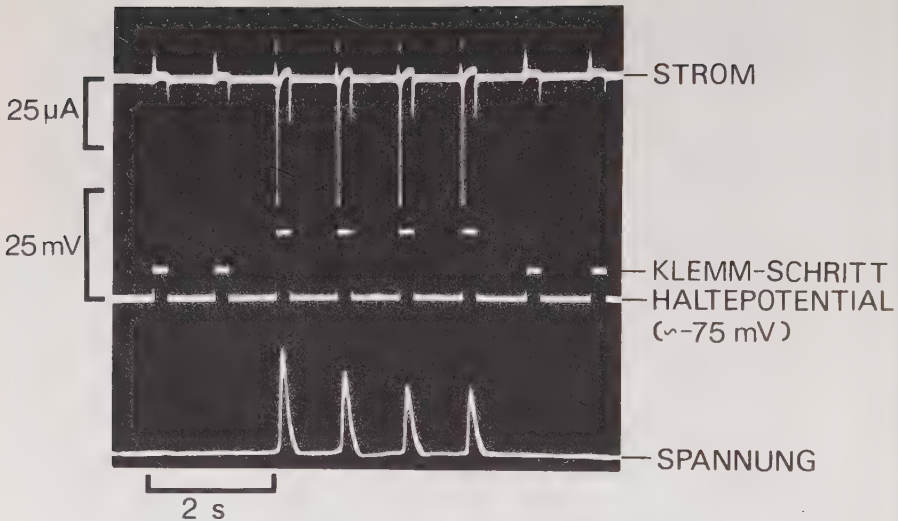


Abb. 5: Originalregistrierungen zur Demonstration der mechanischen Schwelle. Ausgehend von einem Haltepotential von -75 mV wurde das Membranpotential repetitiv um 8 bzw. 15 mV vermindert. 8 mV hohe Klemmimpulse aktivieren weder den schnellen I_{Na} , noch lösen sie eine Kontraktion aus. Im Gegensatz dazu wird durch 15 mV hohe Impulse die Schwelle für I_{Na} und die kontraktile "Alles oder Nichts-Antwort" überschritten. Man beachte, dass bei Wiederholung der knapp überschwelligen Klemmschritte die Kontraktionsamplituden in Form einer negativen Treppe abnehmen.

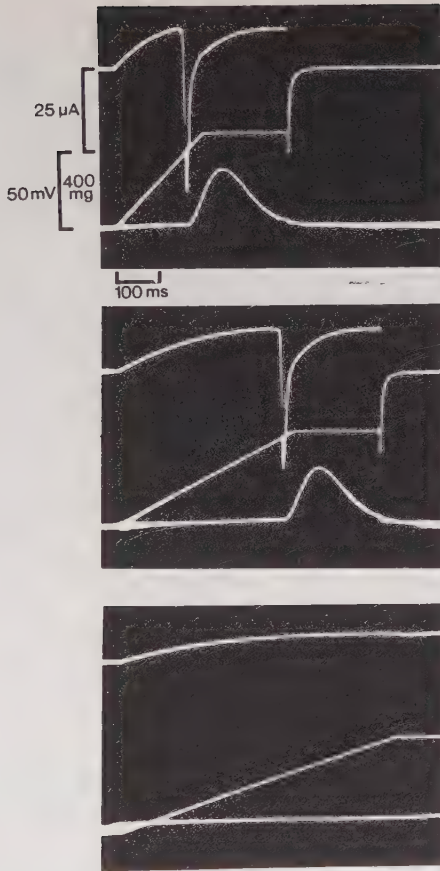


Abb. 6: Originalregistrierungen zur Verdeutlichung der Schlüsselrolle von I_{Na} als Auslöser der mechanischen Antwort. Bei Anwendung trapezförmiger Klemmpulse abnehmender Anstiegssteilheit (jeweils mittlere Spur) verschiebt sich das Schwellenpotential von I_{Na} in Richtung niedrigerer Membranpotentiale. Parallel zur verzögerten Aktivierung von I_{Na} (mittlere Spur) wird die Schwelle zur Kontraktionsauslösung (untere Spur) verschoben. Bei sehr langsamen Klemmschritten werden schliesslich weder der I_{Na} noch eine Kontraktion ausgelöst, obwohl die Membran fast bis auf das Potential "0" depolarisiert wird.

potential zusammen, bei dem der I_{Na} aktiviert wird. Dies steht im Gegensatz zu den Verhältnissen am Froschventrikel (MORAD und ORKAND, 1971; HAAS und KERN, 1971; MORAD und GOLDMAN, 1973) oder Ochsenfroschmyokard (GOTO, KIMOTO und KATO, 1971), wo keine definierte Schwelle existiert, sondern die kontraktile Aktivierung kontinuierlich vom Membranpotential kontrolliert wird.

Die Koinzidenz von der mechanischen Schwelle und der Schwelle des I_{Na} lässt stark vermuten, dass am Warmblütermyokard, ähnlich wie beim Skelettmuskel, ein schneller regenerativer Impuls über das transversale tubuläre System radial ins Zellinnere geleitet wird (COSTANTIN, 1970; ADRIAN, COSTANTIN und PEACHEY, 1969) und dort eine "Alles oder Nichts"-Freisetzung von Aktivatorcalcium aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern des SR auslöst (HUXLEY und TAYLOR, 1958; HODGKIN und HOROWICZ, 1960a; EISENBERG und GAGE, 1969; COSTANTIN, 1971).

3.1.3 Die Abhängigkeit der kontraktilen Aktivität vom Membranpotential (Potential-Kraftbeziehung)

Verschiedene Arbeitsgruppen haben berichtet, dass eine S-förmige Beziehung zwischen Membranpotential und Kontraktionskraft besteht. Diese Potential-Kraftbeziehung beginnt etwa im Bereich des Schwellenpotentials für I_{Na} mit einer relativ schwachen kontraktilen Antwort (BEELER und REUTER, 1970c; GOTO, KIMOTO und KATO, 1971; GIBBONS und FOZZARD, 1971; LEOTY, 1971; LEOTY und RAYMOND, 1972; GIBBONS und FOZZARD, 1975a). Die Kontraktionsamplitude nimmt mit weiterer Depolarisation (zwischen -40 bis 0 mV) steil zu und erreicht etwa im Bereich des "O"-Potentials

ein Plateau (siehe auch FOZZARD und HELLAM, 1968; OCHI und TRAUTWEIN, 1971; NEW und TRAUTWEIN, 1972b).

Bei Untersuchungen zur Abhängigkeit der Kraftentwicklung vom Membranpotential des rhythmisch aktivierten Warmblüter-myokards muss folgendes bedacht werden: Jede Änderung einer elektrischen Grösse (Aktionspotentialdauer oder Dauer und Potential eines depolarisierenden Klemmschrittes) ruft eine Änderung der Kraftentwicklung hervor. Die Kraftentwicklung erreicht jeweils erst nach 8-12 Aktivierungszyklen einen neuen Gleichgewichtszustand (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969; BEELER und REUTER, 1970c; GIBBONS und FOZZARD, 1975a). Im Folgenden wird die Potential-Kraftbeziehung für das Warmblütermyokard deshalb als Beziehung zwischen der mechanischen Gipfelspannung nach Erreichen des steady state und dem jeweiligen Membranpotential angesehen.

In der Abb. 7 ist eine solche Potential-Kraftbeziehung für den Katzenpapillarmuskel wiedergegeben. Der Verlauf der steady state Beziehung unterscheidet sich nicht wesentlich von dem des Hundemyokards (BEELER und REUTER, 1970c), des Meerschweinchenmyokards (OCHI und TRAUTWEIN, 1971) und des Rattenventrikels (LEOTY, 1971; LEOTY und RAYMOND, 1972). Im Gegensatz zu diesen Autoren zeigen unsere Befunde, dass die minimale kontraktile Aktivität (ausgelöst durch schwellennahe Depolarisationen) im Vergleich zur maximal erreichbaren Kraftentwicklung (etwa beim Membranpotential "0") recht gross ist (Verhältnis 1:3). Durch die Höhe des Klemmpotentials wird hauptsächlich die Geschwindigkeit der Kraftentwicklung (dp/dt) variiert (siehe Originalregistrierung in Abb. 7). Die Zeit bis zum Erreichen der Gipfelspannung und die Relaxationsgeschwindigkeit werden kaum beeinflusst; also bestimmt dp/dt die Kontraktionsamplitude.

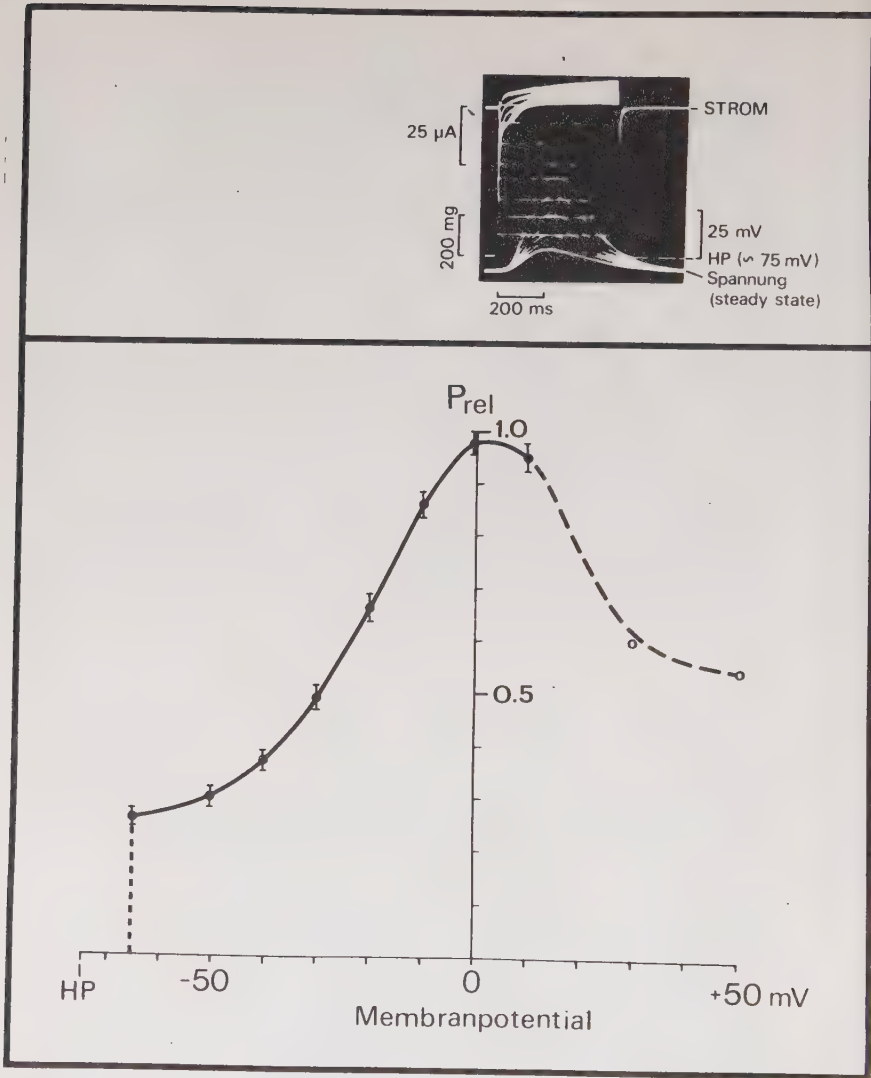


Abb. 7: Potential-Kraftbeziehung isolierter Katzenpapillarmuskeln ($\bar{x} \pm s_x$; $n = 10$). Die Muskeln wurden rhythmisch (60/min) durch Rechteckklemmimpulse von 500 msec Dauer aktiviert. Das Haltepotential betrug -75 mV. Die Gipfelspannung wurde jeweils nach Erreichen eines steady state gemessen und auf ihr Maximum - erreicht etwa bei Potential "0" - bezogen.

Werden anstelle der repetitiven depolarisierenden Klemmschritte Einzelaktivierungen (Intervalle länger als 1 min) gesetzt, dann ändert sich die Potential-Kraftbeziehung erheblich: Im Bereich des Schwellenpotentials ist das Ausmass der kontraktiven Einzelantwort geringfügig stärker als bei rhythmischer Aktivierung (siehe Originalregistrierung der Abb. 5 und 8). Bei weiterer Depolarisation nimmt jedoch jetzt die Kraftentwicklung nur noch sehr wenig zu. Die maximale Kraftentwicklung, die unter diesen Bedingungen bei -15 mV erreicht wird, übertrifft den Wert bei schwellen-naher Aktivierung um nie mehr als 25% (siehe Abb. 8A).

Die Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass durch Einzelklemmschritte, welche die Schwelle für den schnellen I_{Na} überschreiten, eine Art basale kontraktile Aktivierung ausgelöst wird. Diese zeigt jedoch nur eine sehr geringe Abhängigkeit vom Klemmpotential. Sie entspricht mehr einer "Alles oder Nichts"-Antwort. Wird andererseits die Aktivierung rhythmisch wiederholt, so zeigt die Potential-Kraftbeziehung, in dem Potentialbereich, bei dem der längsame Einwärtsstrom (I_{Ca}) aktiviert wird (-40 bis -30 mV; siehe Abb. 8B), einen deutlichen, nach oben gerichteten Knick. Dabei erreicht die Potential-Kraftbeziehung etwa bei "0"-Potential ein Maximum und fällt bei Membranpotentialwerten $< +10$ mV wieder ab¹⁾.

¹⁾ Das Wiederabfallen der Kontraktionsamplitude bei stark positivem Membranpotential steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von OCHI und TRAUTWEIN (1971), GIBBONS und FOZZARD (1971, BEELER und REUTER (1970c), FOZZARD und HELLMAN (1968) und NEW und TRAUTWEIN (1972b), die alle Mikroelektroden zur Kontrolle des Membranpotentials benutzten. Andererseits besteht jedoch Übereinstimmung mit den Befunden von LEOTY (1971) und LEOTY und RAYMOND (1972), die mit der Doppel-Saccharose-trennwand arbeiteten. Es ist schwer zu entscheiden, ob diese Diskrepanz auf der unterschiedlichen Versuchsmethode oder auf Speziesunterschieden beruht.

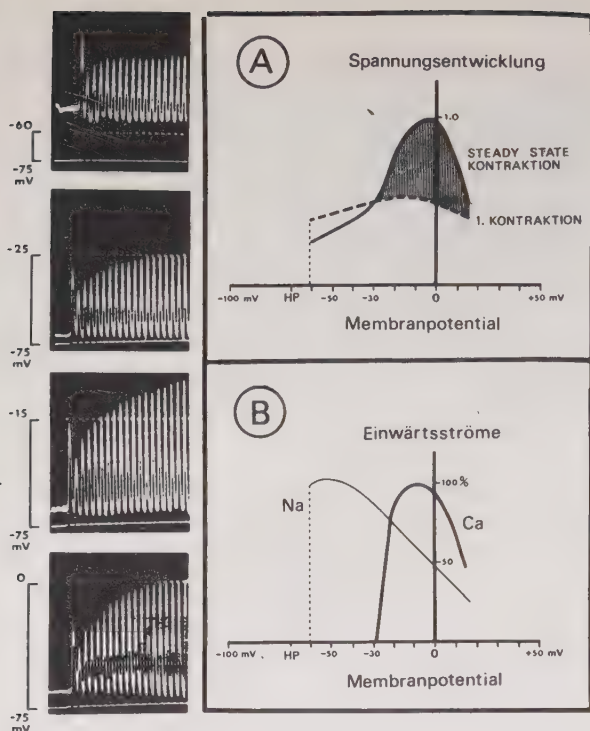


Abb. 8: Potential-Kraftbeziehungen für Einzel- und steady state-Kontraktionen (Rechteckklemmschritte, 200 msec lang). Der Muskel wurde 1 min auf dem Haltepotential (-75 mV) gehalten, bevor er durch repetitive (60/min) Klemmpulse aktiviert wurde (siehe Originalregistrierungen links). In Bildteil A sind die Gipfelspannungen der jeweils ersten Kontraktion (gestrichelte Kurve) und der steady state-Kontraktion (durchgezogene Kurve) gegen das Membranpotential der Klemmpulse aufgetragen. Überschreitet der Klemmpuls das Schwellenpotential um weniger als 25 mV, dann ist die Amplitude der steady state-Kontraktion niedriger als die der Einzelkontraktion. Unter höheren Klemmpulsen nimmt die Amplitude der steady state-Aktivierung in etwa dem Potentialbereich steil zu, bei dem der I_{Ca} aktiviert wird (siehe Bildteil B). Die Amplituden der Einzelkontraktionen nehmen dagegen nur noch sehr wenig zu. Die schraffierte Fläche in Bildteil A kennzeichnet die Differenz zwischen den Amplituden der Einzel- und der steady state-Kontraktionen. Sie ist Mass für die "Zuggewinnaktivierung".

Subtrahiert man die Amplitude der "Alles oder Nichts"-Aktivierung von der steady state Amplitude, dann erhält man ein Mass für den kontraktilen Zugewinn durch repetitive Aktivierung des Myokards. Diese "Zugewinnaktivierung" ist in Abb. 8 durch den gestrichelten Bezirk hervorgehoben. Wie später gezeigt werden wird, hängt das Ausmass der "Zugewinnaktivierung" von der Frequenz und (mit gewissen Einschränkungen) von der Dauer der Klemmimpulse ab. Sie ist Ausdruck des potentialabhängigen transmembranären Calciumeinstroms, der (im Zeitintegral) wiederum den Füllungszustand der intrazellulären Speicher bestimmt.

3.1.4 Die Potential-Kraftbeziehung in Abhängigkeit von der Dauer der Membrandepolarisation (Potential-Kraft-Zeitbeziehung)

Die Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Dauer der Membrandepolarisation wurde durch Anwendung depolarisierender Klemmimpulse unterschiedlicher Dauer (0.5 msec bis 2 sec) und Höhe (Membranpotentialbereich von -60 bis +40 mV) untersucht. Nach Wechsel der Klemmdauer wurde sowohl die Amplitude der ersten Kontraktion als auch die der steady state Aktivierung gemessen. Änderungen der isometrischen Gipfelspannung, hervorgerufen durch Variation der Klemmdauer, beruhten wiederum (siehe auch 3.1.3) vorzugsweise auf Änderungen von dp/dt ; dagegen blieben die Gipfelzeit als auch die Erschlaffungszeit unbeeinflusst.

Die Abb. 9 gibt in einer dreidimensionalen Darstellung die Abhängigkeit der Kraftentwicklung im steady state (Aktivierungsfrequenz 60/min) von der Dauer und der Höhe der depolarisierenden Klemmschritte wieder: Die Intensität der basalen "Alles oder Nichts"-Aktivierung ist nahezu unabhängig von der Dauer des Klemmimpulses (siehe auch Abb. 10). Eine deutliche Zunahme der kontraktilen Aktivität tritt erst dann auf, wenn die depolarisierenden Klemmschritte die Schwelle zur Auslösung des langsamen Einwärtsstromes (etwa bei -35 mV) erreichen

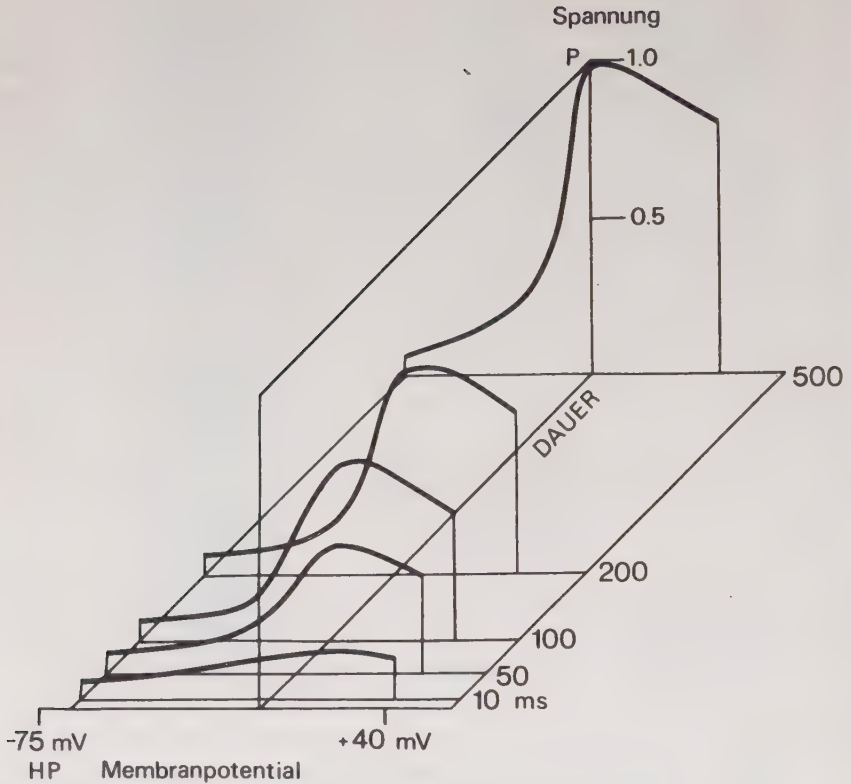


Abb. 9: Potential-Kraft-Zeitbeziehung, erhalten durch Applikation rhythmischer Klemmpulse (60/min) unterschiedlicher Dauer und Höhe. Die Gipfelspannungen wurden jeweils nach Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen bestimmt. Die kritische Klemmdauer zur Kontraktionsauslösung lag bei etwa 0.5 msec. Das Ausmass der Spannungsentwicklung unter diesen kurzen Klemmpulsen unterschied sich nicht von dem, ausgelöst durch 10 msec lange Membrandepolarisationen. Die dreidimensionale Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass erst Klemmpulse von mehr als 10 msec Dauer die Potential-Kraftbeziehung im Bereich des I_{Ca} verstellen (siehe dazu auch Abb. 8). Unter den gewählten Versuchsbedingungen wird eine maximale Kraftentwicklung durch 75 mV hohe und 500 msec lange Klemmpulse erzielt.

bzw. überschreiten. Eine maximale kontraktile Aktivierung wird bei Depolarisation der Myokardmembran auf etwa das O-Potential erreicht, und zwar nahezu unabhängig von der Klemmdauer. Bei sehr kurzdauernden Klemmimpulsen (0.5 bis 10 msec) wird das Ausmass der kontraktilen Aktivierung kaum noch vom Membranpotential beeinflusst. Bei allen Klemmpotentialen wird lediglich die "Alles oder Nichts"-Antwort beobachtet. Unter Verlängerung der Klemmdauer nimmt die mechanische Antwort zu und erreicht bei depolarisierenden Klemmschritten von 500 msec einen Sättigungswert.

Wegen der recht langsamen Zeitkonstanten für die Restitution der intrazellulären Speichersysteme (siehe 3.1.5) erschien uns bei der gewählten Aktivierungsfrequenz von 60/min eine weitere Verlängerung der Depolarisationsdauer nicht sinnvoll. Ein anderes Experiment, durchgeführt bei einer Reizfrequenz von 20/min, zeigte jedoch, dass eine Verlängerung der Depolarisationsdauer über 500 msec hinaus, wieder zu einer Abnahme der isometrischen Gipfelspannung führt.

Bekanntlich wird im Gegensatz zum schnellen I_{Na} der langsame Einwärtsstrom (I_{Ca}) von sehr kurzen Depolarisationen (kürzer als 10 msec) nicht aktiviert (BEELER und REUTER, 1970a,b). Da aber in unseren Experimenten kurzdauernde Membrandepolarisationen regelmässig kleine Kontraktionen auslösten, muss man wiederum schliessen, dass beim Warmblütermyokard wie beim schnellen Skelettmuskel das TTS den I_{Na} in Form eines schnellen regenerativen Impulses ins Zellinnere fortleitet und dort eine Freisetzung von Aktivatorcalcium aus intrazellulären Speichern auslöst.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit dieser intrazellulären Calciumfreisetzung von der Klemmdauer untersucht. Beginnend mit einer Impulsdauer von 10 msec, die den I_{Ca} nicht aktiviert (siehe oben) wurden dazu Serien repetitiver (60/min) depolarisierender Klemmschritte appliziert und die Klemmdauer dann plötzlich verlängert.

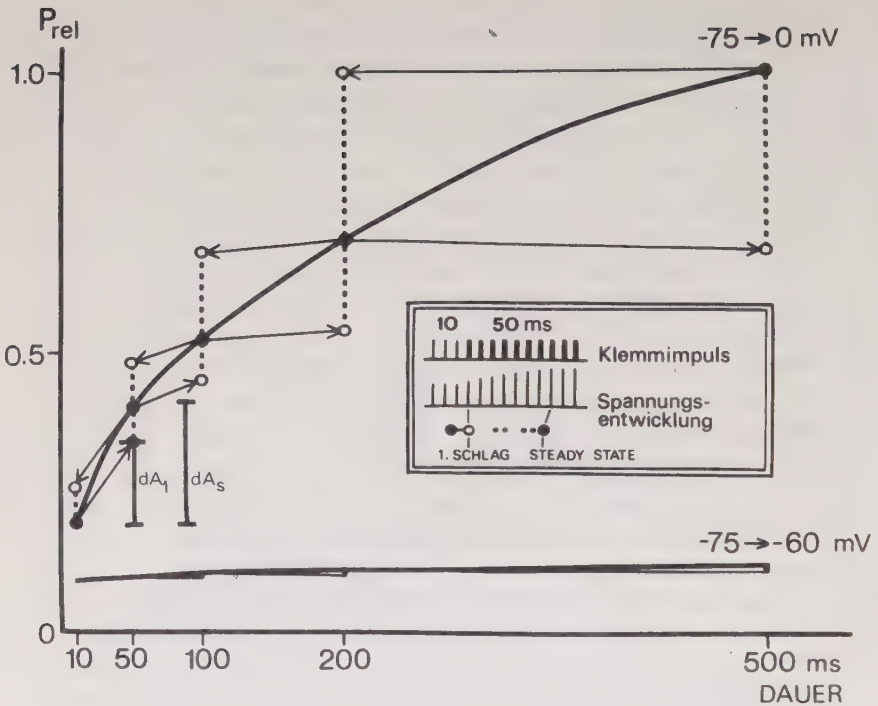


Abb. 10: Beziehung zwischen der Amplitude der steady state-Kontraktion (Frequenz 60/min) und der Dauer des Klemmpulses. Die untere durchgezogene Kurve gibt die Kraftentwicklung unter kleinen Klemmschritten von 15 mV (HP = -75 mV) in Abhängigkeit von der Impulsdauer (Abszisse) wieder, die obere Kurve die Kraftentwicklung bei 75 mV hohen Klemmschritten. Experimenteller Ablauf siehe Einschub. Die Pfeile charakterisieren den Spannungszuwachs oder -abfall der ersten Kontraktion nach veränderter Klemmdauer. Mit schrittweiser Verlängerung der Klemmpulse wird der Spannungszuwachs des ersten Schlages dA_1 zunehmend geringer; bei Abnahme der Impulsdauer nimmt der Spannungsabfall schrittweise zu. Ausgehend von einer Klemmdauer, die eher der Dauer eines normalen Aktionspotentials entspricht (100-400 msec), hat eine Variation der Klemmdauer offenbar nur geringen Einfluss auf die Kraftentwicklung des ersten Schlages, während der nachfolgende Amplitudenzuwachs bis zum steady state (dA_S) zunehmend an Bedeutung gewinnt (siehe auch Abb. 11).

Wie die Abb. 10 zeigt, bewirkt jede Verlängerung der Impulsdauer ein treppenförmiges Anwachsen der Kontraktionskraft bis nach 8 - 15 Schlägen ein neuer steady state erreicht wird (siehe Einschub der Abb. 10). Die durchgezogene Kurve der Abb. 10 gibt die Kraft-Zeitbeziehung unter Gleichgewichtsbedingungen wieder, die offenen Kreise kennzeichnen die Kraftentwicklung des 1. Schlages nach plötzlicher Verlängerung oder Abkürzung der Klemmdauer. Die Höhe der Treppe (1. Schlag bis steady state Kontraktion) wird durch die gestrichelten Linien charakterisiert, welche die offenen Punkte mit den vollen Punkten verbinden.

Unter den in Abb. 10 zusammengefassten Ergebnissen fällt besonders auf, dass das kontraktile System offensichtlich sofort auf jede Änderung der Klemmdauer reagiert. Zur Erklärung dieses Phänomens kann wohl kaum eine Zu- bzw. Abnahme der transmembranären Calciumversorgung durch den I_{Ca} herangezogen werden: Einerseits ist der erregungsbedingte Calciumeinstrom für eine ausreichende Aktivierung der kontraktile Elemente viel zu gering (siehe dazu 3.2.1), andererseits ist der Diffusionsweg von der Membran zu den Myofibrillen verhältnismässig weit. Trotzdem führt eine Verlängerung der Klemmdauer z.B. von 10 auf 50 msec zu einer sofortigen Zunahme der isometrischen Gipfelspannung von 60-70 %. Man muss daher vermuten, dass durch Änderungen der Klemmdauer die Freisetzung intrazellulär gespeicherten Calciums abgestuft werden kann. Wenn diese Vermutung stimmt, so sollte es möglich sein mit Hilfe unterschiedlich langer Klemmimpulse, die Zeitabhängigkeit der Freisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern des SR zu bestimmen.

In dem nächsten Experiment wurde daher der Versuch unternommen, den Zusammenhang zwischen Dauer der Membrandepolarisation und Calciumrelease aus dem SR etwas zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurde der Amplitudenzuwachs für die jeweils erste Kontraktion nach plötzlicher Verlängerung der Klemmdauer bestimmt.

Dieser Amplitudenzuwachs (bzw. die Amplitudenabnahme bei plötzlicher Verkürzung der Klemmdauer) ist in Abb. 10 durch die Steilheit der Pfeile ausgedrückt, die die vollen mit den offenen Punkten verbinden. Dabei charakterisieren die vollen Punkte die Kraftentwicklung, die bei einer gegebenen Depolarisationsdauer unter steady state Bedingungen erreicht wurde, die offenen Punkte die Amplitude des jeweils ersten Schlages nach plötzlicher Veränderung der Depolarisationsdauer.

Trägt man das jeweilige Verhältnis der im steady state schliesslich erreichten Änderung der Kontraktionsamplituden (dA_s) zur Amplitudenänderung des jeweils ersten Schlages (dA_1) gegen die Klemmdauer auf, dann erhält man die in Abb. 11 dargestellte Kurve. Diese Kurve beschreibt in erster Annäherung die intrazellulär freigesetzte Menge an Aktivatorcalcium für jede Depolarisationsdauer. Die Kurve verläuft nahezu exponentiell mit einer Zeitkonstanten von etwa 110 msec. Dies bedeutet, dass für eine 90 %ige Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern die Membrandepolarisation (von -75 bis 0 mV) mindestens 200 msec dauern muss. Diese Zeit entspricht, bezogen auf 37°C, etwa 80% der normalen Aktionspotentialdauer. Unter diesem Aspekt kann man mit einiger Sicherheit sagen, dass physiologischerweise die Freisetzung von intrazellulärem Calcium in ihrem Ausmass weitgehend unabhängig von der Dauer des Aktionspotentials ist und eher der Charakteristik einer "Alles oder Nichts"-Reaktion folgt.

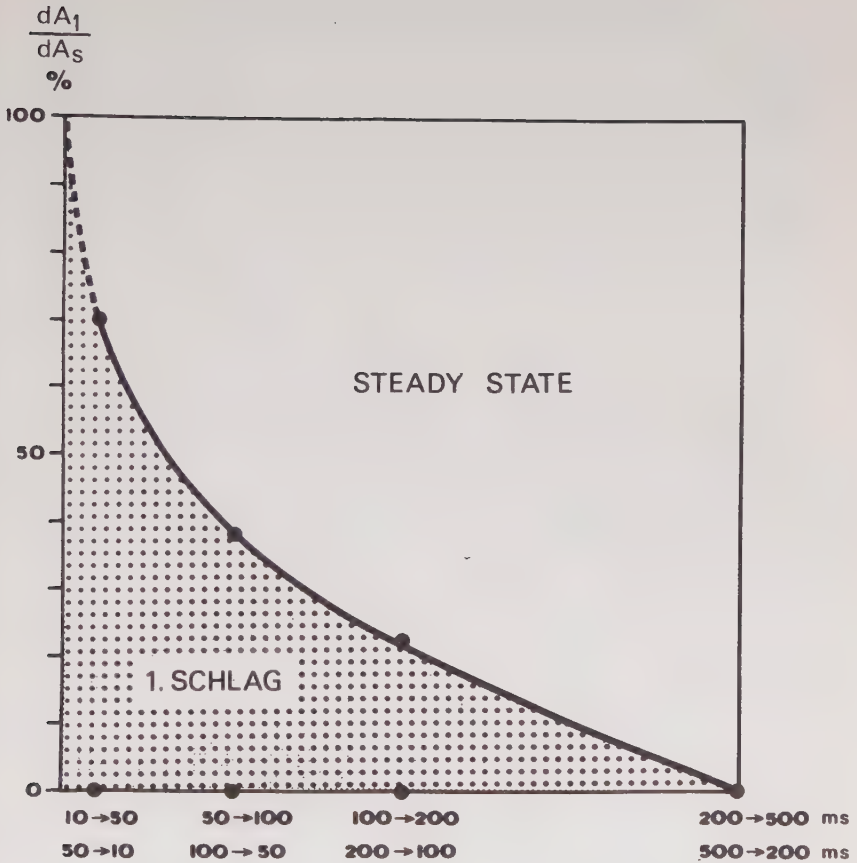


Abb. 11: Amplitudenzuwachs der 1. Kontraktion (dA_1) nach plötzlicher Variation der Klemmdauer im Verhältnis zum jeweiligen Amplitudenzuwachs (dA_S), der nach Erreichen des steady state gemessen wurde (Daten aus den in Abb. 10 dargestellten Messergebnissen). Weitere Erklärungen siehe Text.

3.1.5 Die Erholung der kontraktilen Aktivität nach abgelaufener Kontraktion (Restitution)¹⁾

Experimentelle Befunde weisen darauf hin, dass am Skelettmuskel, aber auch am Herzmuskel, einmal freigesetztes Aktivatorcalcium nicht sofort wieder für eine erneute kontraktile Aktivierung zur Verfügung steht. HODGKIN und HOROWICZ (1960 b) fanden am isolierten Skelettmuskel des Frosches, dass nach Ablauf einer Kontraktur die Amplitude der darauffolgenden Kontraktur von der Höhe des Membranpotentials während der interpolierten Erholungsphase abhängt. Autoradiographische Untersuchungen von WINEGRAD (1965, 1968, 1970) weisen in die gleiche Richtung: Sie lassen nämlich den Schluss zu, dass Ca^{2+} zur kontraktilen Aktivierung aus den lateralen Zisternen freigesetzt wird, während der Relaxation aber in die mittelständigen Bezirke des SR im Bereich der longitudinalen Tubuli zurückgebunden wird. Wiederverfügbar wird dieses Ca^{2+} jedoch erst durch einen weiteren Schritt, indem es vermutlich von den primären Rückbindungsstellen wieder in die lateralen Zisternen weitertransportiert wird (ausführliche Diskussion dieser Vorstellungen siehe 3.2.1). Da der Relaxationsvorgang im Herz- und Skelettmuskel auch bei fortbestehender Depolarisation erfolgt (siehe dazu 3.1.1), muss man annehmen, dass die primäre Calciumrückbindung in das SR vom Membranpotential unabhängig ist. Da andererseits eine nachfolgende Kontraktion gleicher Höhe nur dann erfolgt, wenn die Membran ausreichend lange repolarisiert wurde, besteht der Verdacht, dass der oben angedeutete Calcium-Translokationsprozess vom Membranpotential kontrolliert wird.

¹⁾ In diesem Zusammenhang wird vielfach auch der Ausdruck "restoration" (REUTER, 1973b; TRAUTWEIN, McDONALD und TRIPATHI, 1975) oder "recovery" gebraucht (GIBBONS und FOZZARD, 1971, 1975b). Um Verwechslungen mit der "recovery from inactivation" des langsamen transmembranären Einwärtsstroms (siehe dazu 3.5.1) zu vermeiden, ziehen wir den Begriff "restoration" oder "Restitution" vor (HOMBURGER, SCHLEIERMACHER und ANTONI, 1973).

Auch am Purkinjefaden des Schafes wurde ein im Prinzip ähnliches Restitutionsverhalten der kontraktiven Aktivität festgestellt: GIBBONS und FOZZARD (1971) konnten erstmals zeigen, dass nach Ablauf eines Klemmimpulses die Fähigkeit, durch einen darauffolgenden Klemmschritt gleicher Höhe eine neue Aktivierung auszulösen, von einer Erholungszeit ("recovery") abhing, in der die Membran auf das Haltepotential zurückgeklummt werden musste. Das Ausmass der kontraktiven Restitution hing bei einer Klemmdauer von 1 sec sowohl von dem Membranpotential als auch von der Zeit der Erholung ab.

Im Rahmen unserer Untersuchung an isolierten Trabekeln und Papillarmuskeln von Katzen haben wir diese Phänomene mit exakt demselben experimentellen Versuchsablauf untersucht: In den oberen Teilen der Abb. 12 sind die Versuchsabläufe zur Verdeutlichung schematisch dargestellt: Bei einem rhythmisch aktivierten Präparat wurde das Membranpotential anfänglich für 300 msec durch einen Rechteckimpuls vom Haltepotential (-75 mV) auf ein Membranpotential nahe 40 mV (C_p in Abb. 12) geklemmt. Unter diesem Klemmschritt konnte der Muskel gerade voll erschlaffen. Anschliessend wurde die Membran mit umgekehrter Polarität repolarisiert (I_p). Dabei erfolgte, bevor ein zweiter Klemmschritt auf das 0-Potential ausgelöst wurde, die Repolarisation entweder für 300 msec auf unterschiedliche Membranpotentiale (Abb. 12 links) oder bei vorgegebenem Membranpotential für unterschiedlich lange Zeit (Abb. 12 rechts). Es wurde dann jeweils die isometrische Gipfelspannung (P_t) der Testkontraktion, ausgelöst durch den zweiten depolarisierenden Klemmschritt, gemessen und mit der Kraftentwicklung (P_0) unter dem initialen Klemmsprung korreliert.

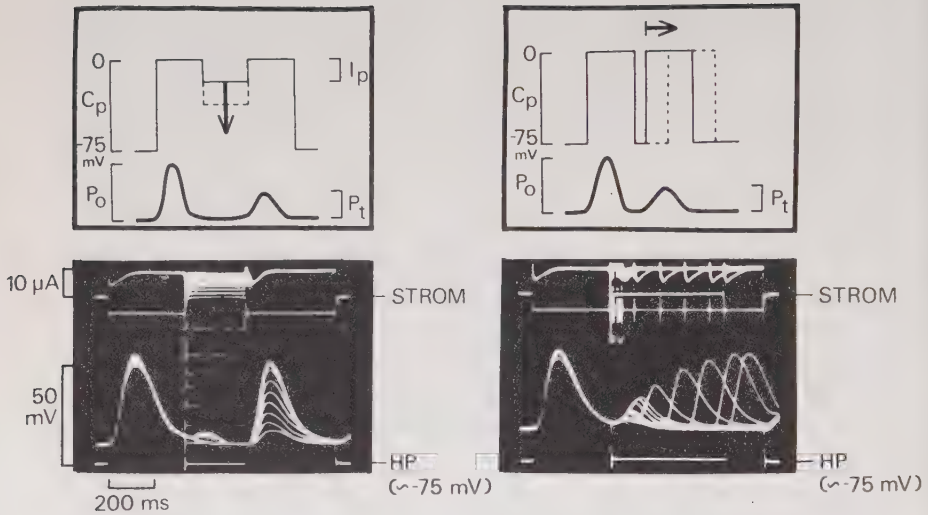


Abb. 12: Restitution der Kontraktion nach interpolierten Klemmschritten bei unterschiedlichen ("diastolischen") Membranpotentialen variabler Dauer. Der experimentelle Verlauf ist schematisch über den Originalregistrierungen wiedergegeben.

Links: Die Kontraktionsamplituden, ausgelöst durch zwei aufeinanderfolgende Klemmschritte (Intervall ca. 400 msec), sind etwa gleich, wenn zwischen den Aktivierungen die Membran auf das Haltepotential zurückgeklemmt wird. Senkung des "diastolischen" Membranpotentials hat eine verminderte Amplitude der nachfolgenden Kontraktion zur Folge.

Rechts: Eine Verlängerung des "diastolischen" Intervalls führt zu einer verstärkten kontraktile Restitution. Die hier dargestellten Registrierungen wurden bei sukzessiver Veränderung der Klemmpulse (keine Gleichgewichtsbedingungen!) gewonnen; sie sollen nur zum Verständnis der in Abb.13 dargestellten steady state-Beziehungen beitragen.

Die Abb. 13 zeigt in einer dreidimensionalen Darstellung die Abhängigkeit von P_t von der Höhe und Dauer des Membranpotentials während der interpolierten Repolarisationsphase. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von GIBBONS und FOZZARD (1971), BEELER und REUTER (1970c) und REUTER (1973b) fanden auch wir eine starke Potentialabhängigkeit von P_t . Die Restitution war bei Repolarisationsintervallen von etwa 500 msec dann nahezu vollständig, wenn das Membranpotential während der "Diastole" auf das Haltepotential zurückgeklemmt wurde (Verhältnis $I_p/C_p = 1$). Wurde allerdings die Membran während der Repolarisationsphase hyperpolarisiert, war in manchen Fällen P_t höher als die Kraftentwicklung (P_o) unter der ersten depolarisierenden Klemme.

Die Zeitabhängigkeit der Restitution ist am besten durch den minimalen Zeitbedarf (ca. 10 msec) charakterisiert, der bei einem Verhältnis von $I_p/C_p = 1$ nötig ist, um gerade eine noch messbare Kraftentwicklung P_t auszulösen. Mit zunehmender Verlängerung des Repolarisationsintervalls nimmt P_t steil zu und erreicht ein Maximum, das wiederum von dem Quotienten I_p/C_p abhängt. Bei einem Verhältnis von I_p/C_p von 0.3 wird mit einem P_t/P_o -Quotienten von 0.3 das Maximum des Restitutionsprozesses bei einem diastolischen Intervall von etwa 280 msec erreicht. Bei voller Repolarisation während der Erholungsphase (I_p/I_c -Verhältnis = 1) erreicht P_t sein Maximum erst nach ca. 700 msec (siehe dazu auch Abb. 14). Unter diesen Versuchsbedingungen ist P_t zuweilen grösser als P_o , sodass der Quotient P_o/P_t grösser als 1.0 wird. Bei weiterer Verlängerung der Erholungsphase nahm P_t wieder langsam ab bis etwa nach 10 - 30 sec ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Dabei konnte oftmals beobachtet werden, dass dieser langsame Abfall - wie schon von GIBBONS und FOZZARD (1971) beschrieben - unter leicht oszillatorischen Schwankungen erfolgte.

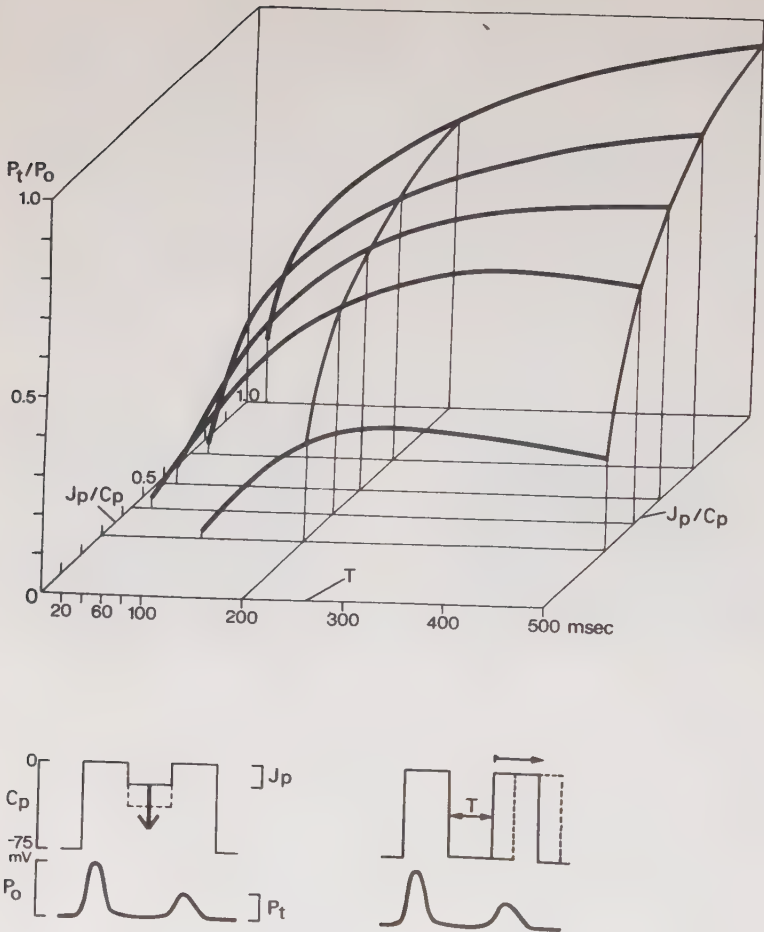


Abb. 13: Einfluss von Höhe und Dauer eines interpolierten Klemmschrittes auf die kontraktile Antwort zweier aufeinanderfolgender Klemmpulse (Dauer 300 msec, Höhe 75 mV, Haltepotential -75 mV). Das Ausmass der kontraktilen Aktivierung (P_t) durch einen zweiten Klemmschritt nimmt sowohl mit dem Intervall (T) als auch mit der Erhöhung des Membranpotentials (I_p) zu. Die verschiedenen Messparameter sind in den schematischen Zeichnungen im unteren Bildteil wiedergegeben. Bei voller Repolarisation zwischen den beiden Klemmschritten ($I_p/C_p = 1$) wird bei einem Intervall von 500 msec keine volle Restitution ($P_t/P_0 = 1$) erreicht.

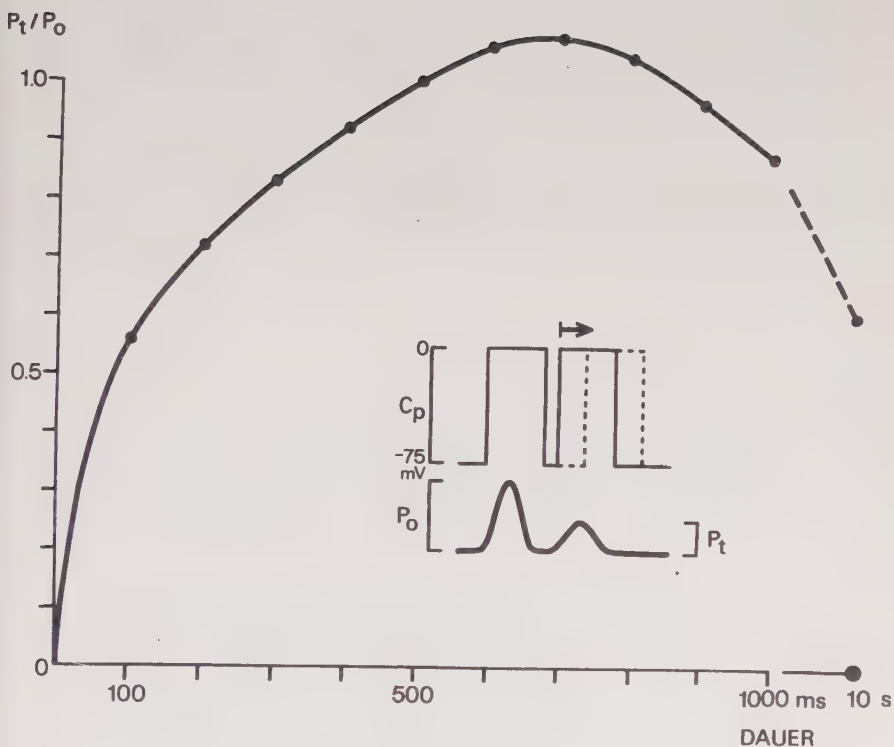


Abb. 14: Beziehung zwischen den kontraktilen Antworten auf zwei Klemmschritte (Klemmdauer 300 msec, -höhe 75 mV) und Dauer der interpolierten Repolarisationsphase. Repolarisation für 700 msec bewirkt, dass P_t/P_o grösser als 1 wird. Bei weiterer Verlängerung der Intervalle nimmt dieser Quotient wieder ab. Experimentelles Vorgehen siehe Einschub.

Die Ergebnisse zum Restitutionsverhalten des isolierten Warmblütermyokards weisen darauf hin, dass der instantane Füllungszustand des intrazellulären Speichers, aus dem Aktivatorcalcium freigesetzt wird, eine Funktion des Membranpotentials und der Zeit ist. Wie die folgenden Kapitel (3.2 und 3.3) zeigen werden, gibt die Füllungskinetik insbesondere dieses Speichers den Schlüssel zum Verständnis schwer verständlicher inotroper Verhaltensmuster, wie Amplituden-Frequenz- und Amplituden-Pausenbeziehung, post-extrasystolische Potenzierung oder Nachkontraktionen in hyperaktivierten Herzmuskelpräparaten (REITER, 1962; KAUFMANN und FLECKENSTEIN, 1965; KAUFMANN, HOMBURGER und TRITTHART, 1969).

3.2 FORMULIERUNG EINES MODELLS DER ELEKTROMECHANISCHEN KOPPELUNG DES WARMBLÜTERMYOKARDS AUF DER BASIS VON CALCIUMBEWEGUNGEN. PROGRAMMIERUNG DER CALCIUMKINETIKEN AUF EINEM ANALOGRECHNER

In der Vergangenheit ist verschiedentlich versucht worden, mathematische Modelle mit dem Ziel zu entwickeln, das kontraktile Verhalten des Herzmuskels bei Änderungen der Arbeitsbedingungen zu beschreiben. Diese Modelle beschäftigen sich zumeist mit den verschiedenen Formen der Kraft-Intervallbeziehung (BRAVENY und KRUTA, 1958; BAUTOVICH, GIBBS und JOHNSON, 1962; BLINKS und KOCH-WESER, 1961, 1963; KOCH-WESER und BLINKS, 1963; JOHNSON, ROWE und VAUGHAN-WILLIAMS, 1964; POSNER und BERMAN, 1967; BENEKEN und DE WIT, 1967; MANRING und HOLLANDER, 1971; SCHAEFER und VAN ZWIETEN, 1971). In den meisten Arbeiten dieser Art wird auf mathematische Formulierungen zurückgegriffen, die eine rein phänomenolo-

gische Analyse der beobachteten Effekte darstellen; davon ausgehend zogen dann die Autoren, angesichts des Fehlens direkter experimenteller Daten, Rückschlüsse auf die in vivo ablaufenden Aktivierungsmechanismen im Rahmen der elektromechanischen Koppelungsprozesse.

In jüngster Zeit ist nun die Zahl gesicherter experimenteller Daten über die Prozesse der elektromechanischen Kopplung in der Warmblüterm yokardzelle erheblich gewachsen. Dies berechtigt den Versuch, ein Modell zu formulieren, dessen Grundannahmen soweit als möglich von den experimentell gesicherten Tatbeständen ausgehen. Ein solches Modell, einmal formuliert, kann sodann auf seine Übereinstimmung mit den Verhaltensmustern des lebenden Herzmuskels überprüft werden, wenn es gelingt, eine computergerechte Formulierung des Modells vorzunehmen.

MANRING und HOLLANDER (1971) konnten bereits zeigen, dass auf der Grundlage einiger weniger, allgemein akzeptierter Prämissen ein Modell der elektromechanischen Koppelung entwickelt werden kann, das nach seiner numerischen Lösung im Digitalcomputer weitgehende Übereinstimmung mit dem kontraktile n Verhaltensmuster des Meerschweinchenvorhofs zeigt. In der Zwischenzeit sind jedoch speziell an der Ventrikelmuskulatur des Warmblüterm yokards durch die Einführung der voltage clamp-Methode in Kombination mit mechanischen Spannungsregistrierungen detailliertere und präzisere Messdaten über die elektromechanischen Koppelungsreaktionen gewonnen worden (siehe dazu 3.1). Es erschien daher sinnvoll und aussichtsreich, auf der Basis dieser Erkenntnisse ein neues Modell der elektromechanischen Koppelung zu entwickeln.

Stellt man die im vorangegangenen Kapitel (3.1) dargestellten Ergebnisse in den Rahmen einer Gesamtkonzeption der elektromechanischen Koppelung, wie sie auch von

anderen Gruppen auf Grund experimenteller Untersuchungen akzeptiert wird (FOZZARD und HELLMAN, 1968; ANTONI, KAUFMANN und JAKOB, 1969; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969; BEELER und REUTER, 1970c; GOTO, KIMOTO und KATO, 1971; OCHI und TRAUTWEIN, 1971; GIBBONS und FOZZARD, 1971, 1975a,b; MORAD und GOLDMAN, 1973; TRAUTWEIN, McDONALD und TRIPATHI, 1975; CHAPMAN und LEOTY, 1976), so erhält man ein recht konsistentes Bild von den elektromechanischen Koppelungsreaktionen in der Warmblütermyokardzelle. Dieses Bild stellt sich in groben Zügen wie folgt dar:

In der Ventrikelmyokardzelle von Säugetieren vollziehen sich die koppelungswirksamen Calciumbewegungen im Bereich zweier Subsysteme:

- I. In einem intrazellulären Speicher- und Abgabesystem, das während eines gegebenen Kontraktionszyklus den Grad und das Ausmass der kontraktiven Aktivierung bestimmt und
- II. in einem transmembranären Calcium-Versorgungs- und Austauschsystem, das zeitintegrierend die Calciummenge bestimmt, die im Speicher- und Abgabesystem zur Verfügung steht.

Das in diesem Kapitel beschriebene Modell der elektromechanischen Koppelung basiert im wesentlichen auf dem oben dargestellten Grundkonzept. Die im Modell enthaltenen physiologischen Postulate berücksichtigen soweit als möglich die verfügbaren experimentellen Daten, die in ihrer Summe ausreichen dürften, um als Basis für die Formulierung eines solchen Modells zu dienen. Auf der anderen Seite sind die derzeitigen Kenntnisse über einige der beteiligten Prozesse sicher noch recht unvollständig. Es ist daher wünschenswert, dass mit Hilfe des vorgeschlagenen Modells Voraussagen gemacht werden können, die später einmal gezielt

in Experimenten nachprüfbar sind. Umgekehrt sollte ein solches Modell auch dazu beitragen, dass schwer interpretierbare experimentelle Resultate hinsichtlich ihrer Deutung leichter interpretierbar werden. Dieser Wunsch ergibt sich bereits aus der ständig wachsenden Menge zuverlässiger Messdaten, durch die das theoretische Konzept der elektromechanischen Koppelung ständig komplexer wird. In dieser Situation wird es zunehmend schwieriger, das funktionelle Wirkungsgefüge rein intellektuell deskriptiv zu erfassen, sodass der Einsatz eines Computers, speziell eines Analogcomputers, hier eine wertvolle und vielseitig einsetzbare Analysenhilfe bietet.

BASSINGTHWAIGHTE und REUTER (1972) haben kürzlich ein Modell der elektromechanischen Koppelung für die Warmblütermyokardzelle entwickelt, das in Form detaillierter und ausführlicher mathematischer Formulierungen alle Calciumbewegungen beschreibt, die vermutlich mit der elektromechanischen Koppelung in Zusammenhang stehen. Ein Teil der postulierten Calciumbewegungen konnte durch Berechnungen auf einem Digitalcomputer als richtig bestätigt werden (BASSINGTHWAIGHTE, BEELER, SIDELL, REUTER und SAFFORD, 1973). Eine numerische Lösung des Gesamtmodells wurde allerdings bisher nicht vorgenommen und wäre auch angesichts der grossen Zahl umfangreicher Gleichungssysteme ausserordentlich schwierig zu erhalten gewesen.

Ein brauchbares Modell der elektromechanischen Koppelung der Myokardzelle muss, falls es Gültigkeit haben soll, die folgenden Gruppen inotroper Verhaltensmuster des Herzens richtig beschreiben:

1. Alle Arten von Amplituden-Intervallbeziehungen einschliesslich
 - a) der Amplituden-Frequenzbeziehung im steady state,

- b) der Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen und
 - c) der postextrasystolischen Potenzierung.
2. Alle Arten inotroper Antworten auf eine Änderung der transmembranären Calciumversorgung einschliesslich besonderer Effekte wie Veränderungen des diastolischen Tonus oder das Auftreten von "Nachkontraktionen" unter bestimmten Voraussetzungen.
 3. Alle Arten von Treppenphänomenen, wobei hier unter Treppenphänomen jede Art von Kontraktionsamplituden-änderung verstanden werden soll, die transitorisch von Schlag zu Schlag über eine gewisse Anzahl von Zyklen abläuft, und zwar als Antwort auf plötzliche Änderungen ganz verschiedener Variabler, wie z.B. Reizintervall oder Aktionspotentialdauer.

3.2.1 Die physiologischen Postulate

Der transmembranäre Calciumeinstrom in die Myokardzelle erfolgt hauptsächlich während der elektrischen Membranerregung. Die Grösse dieses Calciumeinstroms hängt in charakteristischer Weise von der Aktionspotentialdauer und dem Membranpotential ab. Seitdem die voltage clamp-Technik an der Herzmuskelzelle eingeführt wurde, sind die Strom-Spannungsbeziehungen des langsamen Ca^{2+} -Einwärtsstromes sowohl unter dynamischen als auch unter steady state Bedingungen gründlich erforscht worden (z.B. BEELER und REUTER, 1970a,b; REUTER, 1973a,b; NEW und TRAUTWEIN, 1972; GETTES und REUTER, 1974; KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLEP und HERDEY, 1975). Obwohl sich der langsame Einwärtsstrom vom schnellen I_{Na} in vieler Hinsicht unterscheidet und die Leitfähigkeit der Myokardzellmembran für beide Ionen durch jeweils getrennte Membrankanäle kontrolliert wird (siehe dazu Kapitel 1), lassen

sich im kinetischen Verhalten beider Ströme prinzipielle Gemeinsamkeiten erkennen: Der langsame Einwärtsstrom kann wie der schnelle I_{Na} durch HODGKIN-HUXLEY-Gleichungen (1952) beschrieben werden.

Danach ist der Calciumeinwärtsstrom (I_{Ca}), der während der Membranerregung fließt, das Produkt aus der spezifischen Membranleitfähigkeit für Calciumionen (g_{Ca}) und der sie treibenden elektromotorischen Kraft ($E - E_{Ca}$)

$$I_{Ca} = g_{Ca} \cdot (E - E_{Ca}) \quad (1)$$

Die treibende Kraft errechnet sich aus dem Membranpotential (E) und dem Umkehrpotential (E_{Ca}) des Calciumstromes. Das Umkehrpotential ist charakterisiert als das Potential, bei dem der Calciumstrom seine Flussrichtung ändert. Nach der NERNST'schen Gleichung gilt

$$E_{Ca} = \frac{RT}{zF} \cdot \log_e \frac{(Ca^{2+})_o}{(Ca^{2+})_i} \quad (2)$$

(R = Gaskonstante; T = absolute Temperatur; F = Faraday'sche Zahl; z = Wertigkeit).

Die Membranleitfähigkeit g_{Ca} ist das Produkt aus einer Leitfähigkeitskonstanten $\bar{g}_{Ca}$ und dreier dimensionsloser Variablen (d, f, l ; KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLER und HERDEY, 1975). Die Variablen d, f und l (activation, inactivation und recovery from inactivation) können in Abhängigkeit vom Membranpotential und der Zeit jeweils numerische Werte zwischen 0 und 1 annehmen:

$$g_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot d(t) \cdot f(t) \cdot l(t) \quad (3)$$

Zusätzlich zu diesem Calciumeinstrom in der elektrischen Systole muss aber auch ein kleiner, nicht zu vernachlässigender Ca^{2+} -Leckstrom während der elektrischen Diastole postuliert werden, entsprechend dem hohen $(Ca^{2+})_o / (Ca^{2+})_i$ Gradienten an der Zellmembran von ca. 10 000 : 1. Die Existenz

eines Ruheeinwärtsstromes von Ca^{2+} ist mehrfach durch tracer flux Messungen nachgewiesen worden (WINEGRAD und SHANES, 1962; NIEDERGERKE, 1963; LANGER und BRADY, 1963; LANGER, 1968).

Bei Ventrikelfasern von Säugetieren ist die Calciummenge, die während des Aktionspotentials insgesamt in die Zelle einströmt, viel zu gering, um eine ausreichende kontraktile Aktivierung zu erzeugen. Man geht im allgemeinen davon aus, dass die "freie" Calciumkonzentration im Sarkoplasma $(\text{Ca}^{2+})_i$ des ruhenden Herzmuskels weniger als 5×10^{-7} M beträgt. Bei dieser Konzentration beginnt nach Versuchen in vivo als auch in vitro die Interaktion zwischen Aktin und Myosin (WEBER, HERZ und REISS, 1963, 1967; PORTZEHL, CALDWELL und RÜEGG, 1964; HASSELBACH und WEBER, 1965; EBASHI und ENDO, 1968). Man sollte deshalb annehmen, dass $(\text{Ca}^{2+})_i$ im ruhenden Muskel noch niedriger liegt, also etwa bei $1 - 2 \times 10^{-7}$ M. Für eine maximale kontraktile Aktivierung auf einen Reiz muss andererseits die Calciumkonzentration auf 1×10^{-5} M ansteigen.

Nimmt man an, dass für die intrazelluläre Konzentrationsänderung $\Delta M(\text{Ca}^{2+})_i$ die Gleichung

$$\Delta M(\text{Ca}^{2+})_i = \frac{1}{z \cdot F} \int_0^{t_1} I_{\text{Ca}} dt \quad (4)$$

gilt, dann müsste bei einem Muskelpräparat von 0.3 mg (intrazelluläres Volumen ca. 0.2 μl) 10 msec lang ein durchschnittlicher Ca^{2+} -Strom von 40 μA fließen, um 10^{-5} M $(\text{Ca}^{2+})_i$ zu erreichen.

Bei voltage clamp-Untersuchungen werden aber normalerweise langsame Einwärtsströme von bestenfalls 4-6 μA gemessen (z.B. BEELER und REUTER, 1970b; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972). Dieser Calciumstrom bringt also höchstens 1/8 bis 1/10 der Calciummenge, die für eine

volle Kontraktion benötigt wird in die Zelle. Selbst unter der Voraussetzung, dass bei voltage clamp-Untersuchungen am Myokard die Klemme das Membranpotential nicht perfekt kontrolliert, wodurch ein Teil des langsamen Einwärtsstromes nicht erkannt wird, ist es kaum vorstellbar, dass der unentdeckte Stromanteil diese Größenordnung hat. Die Diskrepanz zwischen der Calciummenge, die während einer Reizperiode in die Zelle einströmt und derjenigen, die eine volle Kontraktion hervorrufen würde, lässt sich also - wie bereits an anderer Stelle mehrfach betont - nur durch den Schluss lösen, dass der grösste Teil des kontraktionswirksamen Calciums aus intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums stammt.

Es ist noch ungeklärt, wie eine solche Calciumfreisetzung durch die Membrandepolarisation ausgelöst oder eventuell quantitativ kontrolliert wird. Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die Membrandepolarisation über das TTS ins Zellinnere fortgeleitet wird (siehe Kapitel 1). So hat man an schnellen Skelettmuskelfasern von Fröschen zeigen können, dass ein schneller regenerativer Natriumstrom innerhalb der Membran des T-Systems existiert, der diese Erregungsausbreitung nach innen trägt (COSTANTIN, 1970). Andererseits hat FALK's Analyse (1968) des T-Systems gezeigt, dass auch ein passives Kabelmodell eine schnelle Impulsausbreitung mit ausreichenden Zeit- und Raumkonstanten zulässt. Für die Warmblütermyokardzelle ist es jedoch von untergeordneter Bedeutung, welche der beiden obengenannten Vorstellungen zutrifft, da angesichts des geringen Zelldurchmessers die Propagation eines elektrischen Impulses nur über kurze radiale Distanzen erfolgen muss. Wir können daher annehmen, dass der die Ca^{2+} -Freisetzung auslösende Impuls des Aktionspotentials in jedem Fall nahezu verzögerungsfrei von der Oberfläche in das Innere der Herzmuskelzelle fortgeleitet wird.

Die im vorangehenden Kapitel (3.1.2) dargestellten voltage clamp-Experimente haben in Übereinstimmung mit den Befunden

von BEELER und REUTER (1970c) eindeutig gezeigt, dass am isolierten Warmblütermyokard die mechanische Schwelle und die Schwelle des I_{Na} zusammenfallen (Abb. 5, 6). Wir müssen daher auch für das Warmblütermyokard fordern, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und damit die Kontraktion durch den schnellen Natriumeinwärtsstrom initiiert wird.

Im Gegensatz zu diesem Postulat stehen die voltage clamp Befunde von OCHI und TRAUTWEIN (1971) und GIBBONS und FOZZARD (1971 und 1975). Beide Arbeitsgruppen fanden, dass die Schwelle zur Kontraktionsauslösung in dem Membranpotentialbereich liegt, bei dem der langsame Einwärtsstrom (I_{Ca}) ausgelöst wird. Deshalb müssen wir die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass in unseren Experimenten und denen von BEELER und REUTER (1970c) das Membranpotential durch den Klemmimpuls - insbesondere im TTS - nur ungenügend kontrolliert wurde. Andererseits findet man in den Originalregistrierungen von GIBBONS und FOZZARD (1971, 1975) kleine kontraktile Antworten im Bereich des Schwellenpotentials zur Aktivierung von I_{Na} . Es ist daher durchaus vorstellbar, dass diese Autoren auf Grund der offensichtlichen Schwäche der kontraktile Antworten der Frage, ob I_{Na} die Kontraktion auszulösen vermag, nicht weiter verfolgten.

Unabhängig von dem Problem, welcher der beiden Einwärtsströme die Kontraktion "triggert", besteht weitgehende Übereinstimmung darüber, dass die Freisetzung von Aktivatorcalcium in Form eines autoregenerativen Prozesses abläuft (ENDO, TANAKA und OGAWA, 1970; FORD und PODOLSKY, 1970; FABIATO und FABIATO, 1972, 1973, 1975a). PODOLSKY (1975) zieht für den Ablauf der autoregenerativen Ca^{2+} -Freisetzung in vivo zwei Möglichkeiten in Betracht:

- 1) Das Aktionspotential löst im T-System einen kleinen Ca^{2+} -Einwärtsstrom aus. Die geringe Menge des einströmenden "Trigger-Calciums" initiiert dann eine schnelle Freigabe von Aktivatorcalcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum.

- 2) Die Depolarisation des T-Systems wird auf die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums übergeleitet und erhöht deren Ca^{2+} -Leitfähigkeit, sodass Ca^{2+} entlang dem Konzentrationsgradienten in das Cytosol ausströmt. In diesem Fall besteht die autoregenerative Natur des Prozesses darin, dass das aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ausfliessende Ca^{2+} selbst die Ca^{2+} -Freigabe verstärkt und damit zu einer schnellen Entleerung des Speichers beiträgt.

Soll der Muskel erschlaffen, dann muss das Aktivatorcalcium vom Troponin durch Erniedrigung der sarkoplasmatischen Calciumkonzentration wieder entfernt werden. Dies geschieht, wie man seit den Untersuchungen von EBASHI (1961) und HASSELBACH und MAKINOSE (1961) am Skelettmuskel weiss, durch Rückbindung von Ca^{2+} in das SR. Nach Ansicht der meisten Autoren, die sich mit diesem Problem beschäftigten (HASSELBACH und WEBER, 1965; WEBER, HERZ und REISS, 1967; WEBER, 1971a,b; MAKINOSE, 1971), besteht diese Rückbindung an der Skelettmuskelzelle wie an der Herzmuskelzelle aus zwei nacheinander ablaufenden Prozessen:

- 1) Einem aktiven Transport von Ca^{2+} durch die Membran des SR unter Verbrauch von ATP und
- 2) einer intraluminalen Speicherung.

Neben diesen Befunden aus biochemisch orientierten Untersuchungen gibt es weitere Hinweise für dieses Zweistufenkonzept. Autoradiographische Studien haben ergeben, dass die Calciumspeicherung im SR offensichtlich an einem anderen Ort als die Calciumrückbindung erfolgt: Die primäre Calciumaufnahme erfolgt vorzugsweise im Mittelteil, die endgültige Speicherung in den lateralen Zisternen des longitudinalen Systems (WINEGRAD, 1965, 1968, 1970).

Des weiteren lässt sich dieses Zweistufenkonzept gut in den Rahmen der im vorangegangenen Kapitel (3.1.5) dargestellten

voltage clamp Befunde am isolierten Warmblütermyokard einordnen. Danach erfolgt die Muskelererschaffung weitgehend unabhängig davon, ob die Membran auf das Ruhepotential (Haltepotential) zurückgeklemmt wird (Abb. 4B). Dies bedeutet, dass der erste Schritt der Ca^{2+} -Rückbindung in das SR vom Membranpotential nicht kontrolliert wird.

Calcium, das während der Erschlaffungsphase zurückgebunden wurde, steht als Aktivatorcalcium für eine unmittelbar folgende kontraktile Aktivierung nicht sofort wieder zur Verfügung: Bei Reizung des Myokards erfolgt nur eine äusserst schwache Kontraktion. Erst nach Ablauf von ca. 500 msec ist die kontraktile Aktivität voll restituiert. Weiterhin ist der Restitutionsvorgang noch deutlich abhängig vom Membranpotential in dem Sinne, dass mit abnehmendem Membranpotential eine Verlangsamung eintritt (siehe Abb. 12, 13, 14). Da eine Calciumfreisetzung aus dem SR im Rahmen einer Umkehr des Calciumaufnahme-mechanismus selbst unter optimalen Bedingungen viel zu langsam ist, um eine ausreichende Calciummenge zur kontraktilen Aktivierung zu ermöglichen, muss angenommen werden, dass das primär zurückgebundene Ca^{2+} in einem zeit- und potentialabhängigen Vorgang zuerst in die endgültigen Speicherorte (laterale Zisternen) transferiert wird, bevor es bei Erregung wieder freigesetzt werden kann.

Über den Mechanismus der Translokation von Ca^{2+} aus den primären Rückbindungsorten im SR zu den Speicher- und Freisetzungsorten in den lateralen Zisternen gibt es bis heute keine eindeutige, durch Experimente belegte Vorstellung. Das liegt einerseits daran, dass an isolierten Vesikeln des SR solche Prozesse, die unter der Kontrolle des Membranpotentials ablaufen, nicht studiert werden können, und andererseits daran, dass bei der Präparation die sarkoplasmatischen Anteile, die die lateralen Zisternen bilden, verloren gehen.

Indirekte Hinweise wie diese Translokation ablaufen könnte gibt das Paradoxon, dass im ruhenden Muskel vergleichsweise mehr ^{45}Ca in den lateralen Zisternen als im longitudinalen Anteil des sarkoplasmatischen Retikulums nachweisbar ist (WINEGRAD, 1965, 1968, 1970), obwohl das Verhältnis der jeweiligen Volumina viel kleiner geschätzt wird (PEACHEY, 1965). Es muss daher gefordert werden, dass in den lateralen Zisternen Ca^{2+} an eine calciumadsorbierende Substanz gebunden wird. Durch diese Ca^{2+} -Pufferung kann ein Konzentrationsgradient zwischen primären Rückbindungsorten und den Calciumspeichern in den lateralen Zisternen aufrechterhalten werden, entlang dem Ca^{2+} diffundiert. Die Annahme eines solchen Ca^{2+} -Adsorbers oder Puffers (BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972) in den lateralen Zisternen erscheint auch aus weiteren Gründen sinnvoll:

- 1) Akkumulation von Ca^{2+} hemmt in isolierten Vesikeln die ATP-Hydrolyse und die Aufnahme von Calcium (WEBER, 1971a). Die Entfernung von Ca^{2+} aus den primären Rückbindungsorten kann daher zu einer effektiveren Elimination von Calcium aus dem Sarkoplasma führen.
- 2) Im Vergleich zum Skelettmuskel ist das sarkoplasmatische Retikulum des Myokards sparsam ausgebildet. Eine maximale kontraktile Aktivierung durch Freisetzung freien intraluminälen Calciums ist möglicherweise nicht ausreichend. Durch kurzfristige Anlagerung von Ca^{2+} an spezifische "Adsorber" könnte die insgesamt (freies und gebundenes Calcium) gespeicherte und freisetzbare Calciummenge wesentlich erhöht werden.

Über die Natur des "Calciumadsorbers" im SR ist bislang nichts bekannt. Es wird vermutet, dass die im Elektronenmikroskop auffallenden elektronendichten Strukturen im Bereich der lateralen Zisternen (FAWCETT und McNUTT, 1969) aus Material mit hoher Calciumaffinität bestehen.

Die Annahme eines Calciumadsorbers in den lateralen Zisternen könnte auch die Potentialabhängigkeit der Ca^{2+} -Translokation erklären: Die Membranen der lateralen Zisternen stehen bekanntlich mit den impulsleitenden Membranen des TTS in zum Teil engem Kontakt und sind durch sogenannte "Triaden" mit ihnen verbunden. Es erscheint daher vorstellbar, dass die Bindungskapazität des Adsorbers vom Membranpotential bestimmt wird. Entsprechend der Potentialabhängigkeit der Restitution (siehe 3.1.5) ist zu fordern, dass bei hohem Membranpotential eine hohe Ca^{2+} -Affinität vorliegt, sodass durch den entstehenden grossen intraluminalen Calciumgradienten die Translokation schnell abläuft. Bei Depolarisation wird durch Verminderung der Ca^{2+} -Bindung einerseits die Translokation erschwert, andererseits steht vermehrt freies Calcium zur kontraktile Aktivierung zur Verfügung.

Die Calciumabgabe aus der Myokardzelle in den extrazellulären Raum scheint hauptsächlich das Ergebnis eines Transportvorganges zu sein, bei dem extrazelluläres Natrium gegen intrazelluläres Calcium ausgetauscht wird (REUTER und SEITZ, 1968; GLITSCH, REUTER und SCHOLZ, 1970; JUNDT, PORZIG, REUTER und STUCKI, 1975; BENNINGER, EINWÄCHTER, HAAS und KEPN, 1976). Auch am Tintenfischaxon (BAKER, BLAUSTEIN, HODGKIN und STEINHARDT, 1969) und am Skelettmuskel des Frosches (COSMOS und HARRIS, 1961) scheint Calcium mit Hilfe einer solchen Austauschdiffusion aus der Zelle eliminiert zu werden. Es wird postuliert, dass am Herzmuskel zwei Natriumionen gegen ein Calciumion ausgetauscht werden. Dabei ist bis heute nicht völlig geklärt, ob die Energie, die für den Ca^{2+} -Transport gegen den Konzentrationsgradienten benötigt wird, allein aus dem Natriumgradienten gewonnen, oder ob zusätzlich ATP für den Transport benötigt wird. Sicherlich wird indirekt ATP zur Aufrechterhaltung des Natriumgradienten gebraucht.

Für einen Ca-Na-Austausch, der von der energetischen Situation des Herzens weitgehend unabhängig ist, muss man fordern, dass der Calciumefflux aus einem intrazellulären Kompartiment erfolgt, dessen Konzentrationsgradient für Ca^{2+} mit dem des transmembranären $(\text{Na}^+)^2$ -Gradienten im Gleichgewicht steht. Setzt man voraus, dass die Affinitäten der Transportsysteme für Na^+ und Ca^{2+} an der Membraninnen- und -aussenseite gleich sind, dann gilt für die Ca^{2+} -Verteilung im Gleichgewicht

$$\frac{(\text{Ca}^{2+})_i}{(\text{Ca}^{2+})_o} = \frac{(\text{Na}^+)_i^2}{(\text{Na}^+)_o^2} \quad (5)$$

Setzt man in die Gleichung (5) die üblichen extrazellulären Ionenkonzentrationen $(\text{Ca}^{2+})_o = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $(\text{Na}^+)_o = 136 \times 10^{-3} \text{ M}$ und für $(\text{Na}^+)_i = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ein (LEE und FOZZARD, 1974), so ergibt sich, dass auf der Basis einer energieunabhängigen Austauschdiffusion $(\text{Ca}^{2+})_i$ auf etwa $2.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ reduziert werden kann. Man muss annehmen, dass die sarkoplasmatische Konzentration an freiem Ca^{2+} im ruhenden Muskel ca. 10^{-7} M beträgt (WEBER, HERZ und REISS, 1963; CALDWELL und RUEGG, 1964; KATZ, 1973). Dies bedeutet, dass aus dem Cytosol Ca^{2+} nur unter Verbrauch zusätzlicher Energie eliminiert werden kann. Untersuchungen am Tintenfisch-axon (BAKER, 1972; BAKER und GLITSCH, 1973; DIPOLO, 1973; MULLINS und BRINLEY, 1975) haben ergeben, dass hier die Aus-schaidiffusion von der metabolischen Situation der Zellen beeinflusst wird. Es wird angenommen, dass in Anwesenheit von ATP die Affinitäten der Transportsysteme für Ca^{2+} und Na^+ so verändert werden, dass die Benutzung des Natriumgradienten erleichtert wird. Im Gegensatz dazu fanden JUNDT, PORZIG, REUTER und STUCKI (1975), dass am isolierten Herzmuskel der Ca^{2+} -Efflux durch Cyanid nicht gehemmt, sondern - auf Grund einer vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien - verstärkt wird.

Sollte an der Myokardzelle die Na-Ca-Austauschdiffusion tatsächlich unabhängig von der metabolischen Energiegewinnung

sein, dann muss die Grundannahme, der Ca-Na-Austausch finde zwischen Extrazellulärraum und Sarkoplasma statt, in Frage gestellt werden. Man muss fordern, dass Ca^{2+} aus einem intrazellulären Kompartiment eliminiert wird, dessen freie Ca^{2+} -Konzentration grösser ist als 10^{-6} M. Als ein solcher intrazellulärer Pool käme hier beispielsweise das SR in Betracht, das über die lateralen Zisternen in engem Kontakt mit dem Extrazellulärraum steht. Die neuesten autoradiographischen Untersuchungen von WINEGRAD (1970) lassen sehr stark vermuten, dass - zumindest am Skelettmuskel - der Ruheefflux von Ca^{2+} vorwiegend im Bereich der lateralen Zisternen vonstatten geht.

Voltage clamp-Experimente lassen vermuten, dass Ca^{2+} im Sarkoplasma des Myokards nicht gleichmässig verteilt ist. Kalkuliert man nämlich das Calciumumkehrpotential (E_{Ca}) nach der NERNST'schen Gleichung (2), so errechnet sich - setzt man die intrazelluläre Calciumkonzentration kleiner als die Schwellenkonzentration zur Aktin-Myosin-Interaktion (also z.B. $(\text{Ca}^{2+})_i = 2.5 \times 10^{-7}$ M bei $(\text{Ca}^{2+})_o = 2.5 \times 10^{-3}$ M) - ein Umkehrpotential von 122 mV. Im voltage clamp-Experiment wird jedoch nur ein Umkehrpotential von ca. +40 mV gemessen (BEELER und REUTER, 1970b,c; BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; REUTER, 1973a,b). Berechnet man die "intrazelluläre" Calciumkonzentration, indem man in die Gleichung (2) für E_{Ca} +40mV einsetzt, so erhält man ein $(\text{Ca}^{2+})_i$ von 1.2×10^{-4} M.

Es muss also ein auf der Membraninnenseite gelegenes Ca^{2+} -Kompartiment mit vergleichsweise hoher Calciumkonzentration postuliert werden. Der Füllungszustand dieses Kompartimentes bestimmt offensichtlich die treibende Kraft für den langsamen, potentialabhängigen Calciumeinstrom (BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; REUTER, 1973a,b; SIMURDA, SIMURDOVA, BRAVENY und SUMBERA, 1976). Auf Grund seiner hohen Calciumkonzentration wird darüberhinaus angenommen, dass zumindest ein Teil des Calcium-

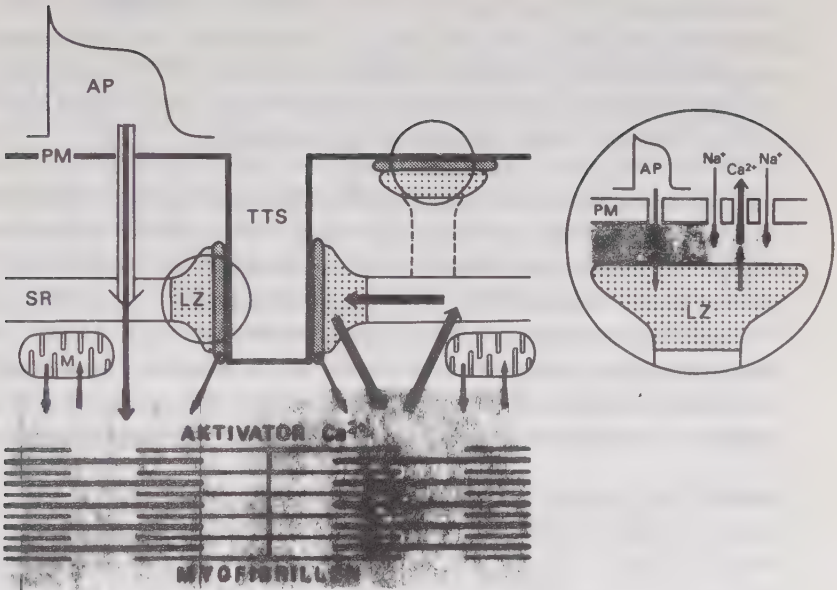


Abb. 15: Schematische Darstellung der wesentlichen physiologischen Postulate des Modells der elektromechanischen Kopplung des Herzens. Der potentialabhängige Ca -Einstrom während eines Aktionspotentials reicht für eine vollständige Kontraktionsaktivierung nicht aus. Es wird daher angenommen, dass die Stärke einer Einzelkontraktion im wesentlichen durch die Ca -Menge bestimmt wird, die aus den intrazellulären Speicherorten des SR freigesetzt werden kann (laterale Zisternen (LZ)). Auslöser für diese Ca -Freisetzung ist vermutlich die über das TTS radial ins Zellinnere fortgeleitete Membrandepolarisation. Zur Muskelerlassung muss das Ca von den kontraktilen Proteinen wieder in das SR zurückgebunden werden. Diese primären Rückbindungsstellen sind vermutlich nicht identisch mit denen, in welchen Ca endgültig gespeichert wird. Damit Ca für die kontraktile Aktivierung wiederverfügbar wird, muss es von den primären Rückbindungsstellen in die lateralen Zisternen transloziert werden. Dieser Schritt wird vom Membranpotential kontrolliert. Der Ca -Efflux geschieht in Form einer Na - Ca -Austauschdiffusion (siehe Kreischnitt). Dabei wird angenommen, dass die Austauschdiffusion über einen subsarkolemmal gelegenen Raum (SS) mit hoher Calciumkonzentration stattfindet.

efflux von diesem intrazellulären Kompartiment aus erfolgt (BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; REUTER, 1973a,b). Entsprechend Gleichung (5) sollte es prinzipiell möglich sein, mit Hilfe der Na-Ca-Austauschdiffusion die Ca^{2+} -Konzentration in diesem intrazellulären Kompartiment ohne Verbrauch von ATP um zwei Zehnerpotenzen zu reduzieren.

Bis heute konnte dieser submembranäre Pool noch nicht eindeutig lokalisiert werden. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (SIMPSON und RAYNS, 1968; FORSSMANN und GIRARDIER, 1970; SOMMER und JOHNSON, 1968; WALKER, SCHRODT und EDGE, 1970) muss angenommen werden, dass er durch die kleinen Räume gebildet wird, die zwischen dem Sarkolemm ("äusseres" Sarkolemm und Sarkolemm der transversalen Tubuli) und den lateralen Zisternen des SR liegen ("subsarcolemmal space").

Tracerflux Messungen haben gezeigt, dass es in der Zelle weitere langsam austauschende Calciumkompartimente geben muss, die nicht direkt an den dynamischen Calciumbewegungen des kontraktile Zyklus beteiligt sind (zusammenfassende Darstellung LANGER, 1968). Ihre Existenz dürfte allerdings wenig Bedeutung für die Gesamtbilanz der myokardialen Calciumversorgung haben. Zur Vereinfachung werden in dem hier dargestellten Modell die Mitochondrien als Repräsentanten all dieser langsam austauschenden Calciumkompartimente in der Zelle betrachtet. Abb. 15 zeigt schematisch die aufgestellten physiologischen Postulate.

3.2.2 Das Reaktionsschema und seine mathematische Formulierung

Da nur ein Analogrechner mittlerer Grösse zur Verfügung stand (siehe 2.3.4), musste die Zahl der Differentialgleichungen begrenzt und die mathematischen Formulierungen der beteiligten Reaktionen vereinfacht werden. Folglich konnten auch die üblichen Standardgleichungen zur Beschreibung der potential- und zeitabhängigen Ionenbewegungen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) durch die Myokardzellmembran nicht verwendet werden. Lediglich der langsame (Calcium-) Einwärtsstrom wurde in Form modifizierter HODGKIN-HUXLEY Kinetiken programmiert. Ansonsten wurden einfache Reaktionskinetiken erster oder zweiter Ordnung eingesetzt, die bei potentialabhängigen Vorgängen durch entsprechende Koeffizienten ergänzt wurden.

Das vorliegende Modell berücksichtigt keine Mechanismen der Energiegewinnung oder -umwandlung. Es wird also vorausgesetzt, dass die verfügbare Energie kein limitierender Faktor des Systems ist.

Abb. 16 gibt das Reaktionsschema wieder. Ausgangshypothese ist, dass die Calciumbewegungen zwischen 6 Kompartimenten stattfinden. Dabei steht:

- (e) für Calcium im extrazellulären Raum
- (c) für "freies" sarkoplasmatisches Calcium,
- (m) für mitochondriales Calcium,
- (s) für Calcium in subsarkolemmal gelegenen Räumen,
- (f) für Calcium, das an primäre Rückbindungsstellen des SR gebunden ist,
- (l) für Calcium in endgültigen Speicherorten des SR.

Das transmembranäre Calciumaustausch- und Versorgungssystem wird durch vier Reaktionen beschrieben, von denen drei den

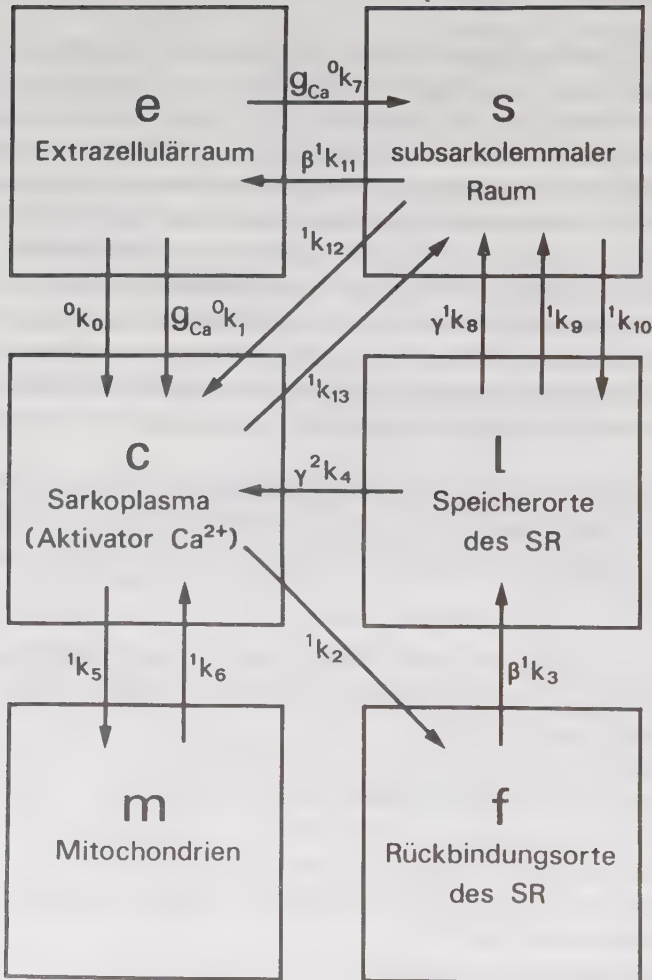


Abb. 16: Reaktionsschema des Modells der elektromechanischen Koppelung. Calciumbewegungen finden zwischen 6 Kompartimenten statt. β und γ sind potentialabhängige Koeffizienten, die vom Membranpotential, wie in Abb. 17 gezeigt, abhängen. g_{Ca} beschreibt die potential- und zeitabhängige Veränderung der Membranleitfähigkeit für Calciumionen (siehe Abb. 18, 20).

Calciumeinstrom und einen Calciumausstrom bestimmen. Die Komponenten des Calciumeinstroms sind:

- 1) Ein kleiner, potentialunabhängiger "Leckstrom" $\text{O}_{k_{0e}}$, der nur durch den hohen (Ca^{2+}) -Konzentrationsgradienten zwischen dem extrazellulären (e) und intrazellulären Raum (c) bestimmt wird. (Da zwischen (e) und dem subsarkolem-malen Raum (s) nur ein vergleichsweise geringes Konzentrationsgefälle existiert (siehe unten), wurde hier auf die Programmierung eines Leckstromes verzichtet).
- 2) und 3) Die potentialabhängigen Calciumströme $g_{\text{Ca}}\text{O}_{k_{1e}}$ und $g_{\text{Ca}}\text{O}_{k_{7e}}$. Dabei charakterisiert g_{Ca} die potential- und zeitabhängige Leitfähigkeit des langsamen Membrankanals für Ca^{2+} . Auf Grund der unterschiedlichen transmembranären Konzentrationsgradienten, die jeweils die elektromotorische Kraft für den I_{Ca} bestimmen, ist O_{k_1} wesentlich grösser als O_{k_7} .

Da der extrazelluläre Raum als unbegrenzt angesehen wird, wurden zur Beschreibung der transmembranären Einwärtsbewegungen Kinetiken nullter Ordnung verwandt.

Unter Gleichgewichtsbedingungen muss der Calciumeinstrom mit einem Calciumausstrom im Fließgleichgewicht stehen. Das vorliegende Modell geht davon aus, dass das aus der Zelle ausströmende Calcium aus einem kleinen, membran-nahen Kompartiment mit hoher Calciumkonzentration stammt. Es wird angenommen, dass dieser Calciumpool durch die kleinen Räume gebildet wird, die subsarkolemmal zwischen den lateralen Zisternen des SR und äusserem Sarkolemm bzw. dem Sarkolemm des TTS liegen (siehe Kreisausschnitt in Abb. 15).

Nach voltage clamp-Untersuchungen (BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; REUTER, 1973a,b) muss angenommen werden, dass es in der Herzmuskelzelle membran-nahe Calciumspeicher gibt,

deren hohe Calciumkonzentration das Calciumumkehrpotential von ca. +40 bis 50 mV bestimmen. Die mit einem solchen Umkehrpotential zwangsläufig verbundene "intrazelluläre" Calciumkonzentration von etwa 10^{-4} M bietet die Voraussetzung für einen wirksamen Calciumabgabemechanismus aus der Zelle. Zieht man in Betracht, dass $(Ca^{2+})_o$ normalerweise bei etwa 2.5×10^{-3} M und das "freie" $(Ca^{2+})_i$ bei 2×10^{-7} M liegt, so wird deutlich, dass ein Calciumefflux gegen einen Konzentrationsgradienten von vier Zehnerpotenzen nur mit erheblichem Energieaufwand möglich wäre. Es wird daher angenommen, dass die Ca^{2+} -Elimination in Form einer Na-Ca-Austauschdiffusion zwischen Extrazellulärraum und den subsarkolemmal gelegenen Räumen erfolgt. Der Energiebedarf für den Calciumausstrom wird mit Hilfe des einwärtsgerichteten Natriumgradienten gedeckt. Bei Membrandepolarisation, die mit einem Natriumeinwärtsstrom und Zunahme von $(Na^+)_i$ verbunden ist, muss zwangsläufig die Austauschdiffusion gehemmt werden. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von MULLINS und BRINLEY (1975), die am Tintenfisch-axon eine Hemmung der Austauschdiffusion bei Membrandepolarisation nachweisen konnten. Im vorliegenden Modell wird der potentialabhängige Calciumausstrom durch die Reaktion β^{1k}_{11} beschrieben.

Das Calcium, das über die Konzentrationsschleuse des subsarkolemmalen Raumes aus der Zelle eliminiert wird, stammt aus den lateralen Zisternen des SR. Der Ca^{2+} -Austausch, der zwischen diesen beiden Kompartimenten stattfindet, wird in zwei gegenläufige, potentialunabhängige Reaktionen erster Ordnung ($^{1k}_{9l}$ und $^{1k}_{10s}$) und eine potentialabhängige Reaktion erster Ordnung (γ^{1k}_{8l}) unterteilt.

Das intrazelluläre Calciumspeicher- und Abgabesystem umfasst drei Reaktionssysteme:

- 1) Die Calciumbewegungen zwischen dem myofibrillären Raum (c) und SR (l, f),
- 2) den Calciumaustausch mit den Mitochondrien (m) und
- 3) den Calciumaustausch mit dem subsarkolemmalen Raum (s).

Dabei wird für die Calciumaufnahme in das SR ein Zweistufenmechanismus zugrunde gelegt. Der erste Schritt wurde als potentialunabhängige Reaktion erster Ordnung formuliert (1k_2c) und soll die Calciumrückbindung an spezielle Bindungsstellen in der Membran des SR (f-Kompartiment) repräsentieren. Es wird gefordert, dass unter physiologischen Bedingungen die Bindungskapazität sehr gross ist, sodass die Zahl der Bindungsorte kein limitierender Faktor für die Anlage von Calcium darstellt. Mit einem zweiten Schritt wird das Calcium dann in einem potentialabhängigen Schritt von diesen primären Aufnahmeorten (f) des SR in Speicherkompartimente (l) transferiert (laterale Zisternen des SR). Dieses Zweistufenkonzept gründet sich auf experimentelle Ergebnisse, wonach Calciumionen, die nach einem Kontraktionszyklus aus dem myofibrillären Raum in das SR aufgenommen werden, nicht sofort wieder für die nachfolgende Kontraktion zur Verfügung stehen, sondern erst dann, wenn die Zellmembran zuvor über einen hinreichenden Zeitraum auf einen bestimmten Membranpotentialwert repolarisiert wurde (siehe 3.1.5). Die Potentialabhängigkeit des Koeffizienten β , der den Calciumübertritt in das Speicherkompartiment (l) steuert, wurde in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen (3.1.5) in dem Ausdruck β^1k_3f berücksichtigt (siehe Abb. 6).

Der Calciumausstrom aus dem Speicherkompartiment (l) hängt nach allgemeiner Ansicht in kritischer Weise vom Membranpotential ab und/oder besitzt die Eigenschaft einer autoregenerativen Beschleunigung, d.h. einer (Ca^{2+}) -induzierten

Calciumfreisetzung (ausführliche Darstellung 3.2.1). Um diese Annahme reaktionskinetisch zu formulieren, wurde eine Reaktion zweiter Ordnung ($2k_{41}\cdot c$) unter Einschluss eines potentialabhängigen Koeffizienten γ angenommen. Abb. 17 zeigt, dass γ steil auf ein Maximum ansteigt, wenn das Membranpotential über einen kritischen Wert hinaus depolarisiert wird. Der Beginn des steilen Anstiegs fällt mit der Aktivierung des schnellen Natriumeinwärtsstroms zusammen. Diese Prämisse basiert auf den in Kapitel 3.1.2 dargestellten voltage clamp-Ergebnissen, die gezeigt haben, dass die sogenannte mechanische Schwelle mit der Schwelle zur Aktivierung des schnellen Natriumeinwärtsstroms identisch ist.

Dieser Teil des Modells erhebt keinen Anspruch, die Calciumbewegungen zwischen den Myofibrillen und dem SR in ihren einzelnen Kinetiken korrekt wiederzugeben, so wie man sie etwa aus Untersuchungen an isolierten Präparationen des sarkoplasmatischen Retikulums kennt. Für die Zwecke dieses Modells erschien es jedoch ausreichend, lediglich eine summarische Beschreibung der Calciumrückbindung in das SR zu geben.

Schliesslich enthält das Modell noch den subsarkolemmalen (s) und den mitochondrialen Calciumpool (m). Auf Grund des geringen Fassungsvermögens des s-Kompartimentes wird angenommen, dass nur sehr geringe Calciummengen über die Reaktionen $1k_{12}$ und $1k_{13}$ mit dem Sarkoplasma ausgetauscht werden können. Im Falle des mitochondrialen Calciumpools wird postuliert, dass er über relativ langsame Reaktionen Calcium aus dem myofibrillären Raum aufnimmt ($1k_{5c}$) bzw. in das Sarkoplasma abgibt ($1k_{6m}$).

Das Gesamtmodell kann mathematisch nur als Ganzes durch folgende Differentialgleichungen beschrieben werden:

$$\frac{dc}{dt} = e (^0k_0 + g_{Ca} {}^0k_1) + c (l \gamma^2 k_4 - {}^1k_2 - {}^1k_{13}) + m {}^1k_6 + s {}^1k_{12} \quad (6)$$

$$\frac{ds}{dt} = l (\gamma {}^1k_8 + {}^1k_9) + s (\beta {}^1k_{11} + {}^1k_{10} + {}^1k_{12}) + e g_{Ca} {}^0k_7 + c {}^1k_{13} \quad (7)$$

$$\frac{dl}{dt} = f \beta {}^1k_3 + s {}^1k_{10} - l (c \gamma^2 k_4 + \gamma {}^1k_8 + {}^1k_9) \quad (8)$$

$$\frac{df}{dt} = c {}^1k_2 - f \beta {}^1k_3 \quad (9)$$

$$\frac{dm}{dt} = c {}^1k_5 - m {}^1k_6 \quad (10)$$

$$e = \text{konstant} \quad (11)$$

Die potential- und zeitabhängige Membranleitfähigkeit für Calciumionen (g_{Ca}) wird dabei auf der Basis modifizierter HODGKIN-HUXLEY Differentialgleichungen nach KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLER und HERDEY (1975) wie folgt formuliert:

$$\frac{dd}{dt} = \alpha_d (1-d) - \beta_d d \quad (12)$$

$$\frac{df}{dt} = \alpha_f (1-f) - \beta_f f \quad (13)$$

$$\frac{dl}{dt} = \alpha_l (1-l) - \beta_l l \quad (14)$$

Die Koeffizienten β und γ (Gleichungen 6-11) sowie die Variablen d , f und l (Gleichungen 12-14) hängen vom Membranpotential (E_m) in der Weise ab, wie in Abb. 17 gezeigt.

In dem hier formulierten Modell sind keine Annahmen über solche Prozesse gemacht, die zwischen der Calciumfreisetzung und der eigentlichen Querbrückeninteraktion ablaufen, also speziell im Bereich der regulativen Proteine. In sehr vereinfachender Weise wurde hierzu lediglich postuliert:

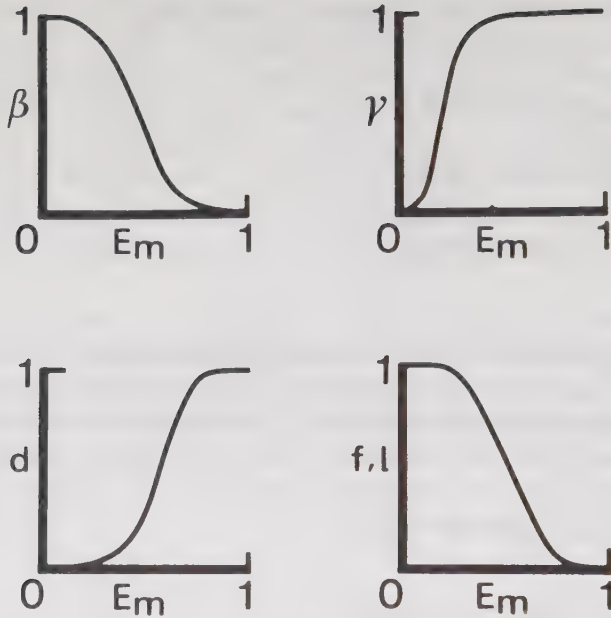


Abb. 17: Abhängigkeit der Koeffizienten β und γ bzw. der Variablen d , f und l vom Membranpotential. Im Computer kann die Abstufung des Membranpotentials zwischen "0" Recheneinheit (angenommene Lage des Kalium-Gleichgewichtspotentials) und "1" Recheneinheit (angenommene Lage des Natrium-Gleichgewichtspotentials) variiert werden.

- 1) Die Reaktionskette zwischen Calciumfreisetzung aus dem l-Kompartiment und messbarer mechanischer Aktivität kann summarisch in erster Näherung durch einen zeitintegrierenden Schritt beschrieben werden.
- 2) Die mechanische Aktivierung ist mit der myofibrillären Calciumkonzentration im steady state über eine S-förmige Beziehung verbunden, in der ein kritischer Schwellenwert für die Kontraktionsauslösung bzw. ein Sättigungswert für maximale Aktivierung enthalten ist.

3.2.3 Die Programmierung des Computers

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen das Schaltprogramm des Analogcomputers. Es handelt sich hierbei um zwei miteinander verknüpfte Rechenprogramme, dem eigentlichen Analogmodell der elektromechanischen Koppelung des Herzens (Abb. 19) und einem Modell, das auf der Basis von HODGKIN-HUXLEY Kinetiken ein elektrisches Analogon des potentialabhängigen Calcium-einwärtsstromes nachbildet (Abb. 18).

Zum Betrieb werden Aktionspotentiale¹⁾ auf die Eingänge der

1) Die Aktionspotentiale wurden in einem separaten Analogmodell auf der Grundlage der charakteristischen Strom-Spannungsbeziehungen der Herzmuskelmembran nachgebildet. Dieses Modell wurde im Detail von KRAUSE, ANTONI und FLECKENSTEIN (1966) beschrieben. Die elektrischen Parameter der künstlich gebildeten Aktionspotentiale, im Besonderen die Aktionspotentialdauer, hängen vom gewählten Erregungsmuster in ganz ähnlicher Weise ab wie in der lebenden Myokardzelle. Wird z.B. die Reizfrequenz erhöht, so verkürzt sich die Aktionspotentialdauer in gleicher Weise wie an der lebenden Herzmuskelzelle. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil die Aktionspotentialdauer die Kontraktionskraft der Myokardzelle bekanntlich entscheidend beeinflusst (KAUFMANN und FLECKENSTEIN, 1965; MORAD und TRAUTWEIN, 1968; ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; KAUFMANN, LAB, HENNEKES und KRAUSE, 1971). Deshalb sind Phänomene der elektromechanischen Koppelung immer dann besonders schwer zu analysieren, wenn Parameter der äusseren Arbeitsbedingungen (z.B. Frequenz) nicht nur in die nachgeschalteten Koppelungsprozesse eingreifen, sondern gleichzeitig auch das Aktionspotential selbst beeinflussen. Infolgedessen kann die Gültigkeit des Modells nur dann geprüft werden, wenn die wichtigsten Verknüpfungen zwischen den verschiedenen Eingangsparametern sorgfältig berücksichtigt werden.

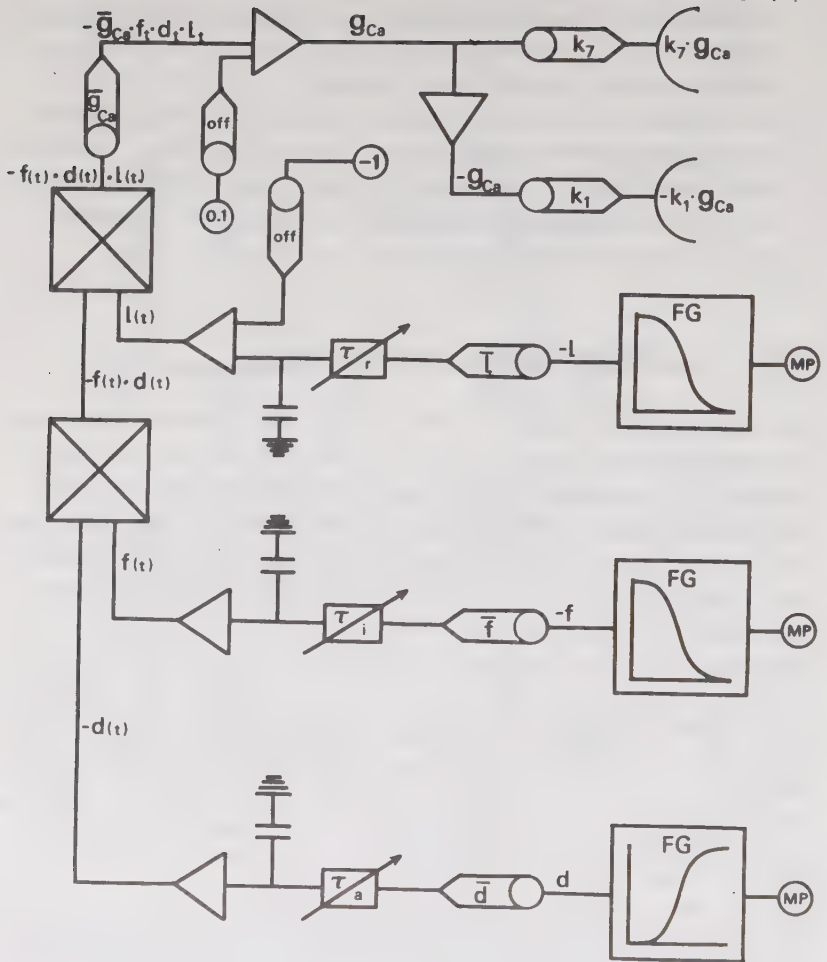


Abb. 18: Programmierschaltbild des Analogcomputers für die Nachbildung des langsamen Einwärtsstromes auf der Basis von HODGKIN-HUXLEY-Gleichungen. MP = Membranpotential (Eingangsgrösse der Funktionsgeneratoren (FG)); $\circ$ = Potentiometer; $\triangle$ = invertierender Summierer; $\boxtimes$ = Multiplizierer; τ = RC-Glied.

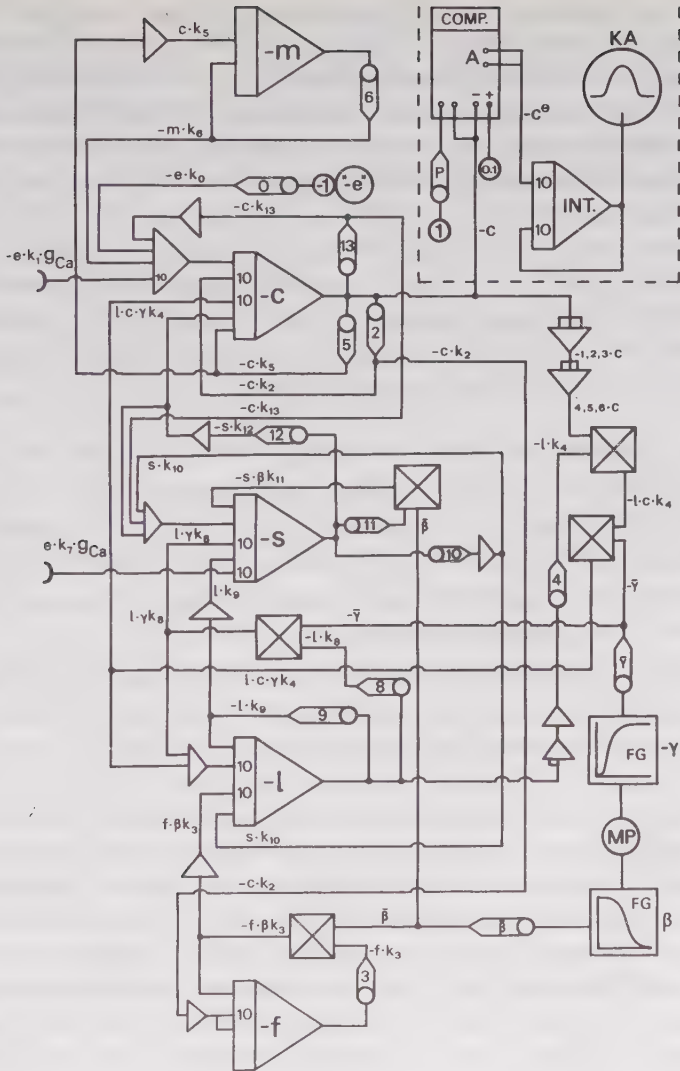


Abb. 19: Programmierschaltbild des Analogcomputers für das Modell der elektromechanischen Koppelung. Der potential- und zeitabhängige transmembranäre Calciumeinwärtsstrom ($g_{Ca} \cdot k$) wurde in einem gesonderten Modell nachgebildet (siehe Abb. 18). KA = Kontraktionsanalog; COMP. = Comparator; INT. = Integrierer; sonstige Schaltsymbole wie in Abb. 18.

Funktionsgeneratoren (FG) gegeben, die dann die potentialabhängigen Koeffizienten β und γ bzw. die potentialabhängigen Variablen d , f und l nachbilden. Die Zeitkonstanten, mit denen die Elementarprozesse im langsamen Membrankanal ablaufen (Aktivierung: τ_a ; Inaktivierung: τ_i und Recovery τ_r), werden durch den Regelwiderstand passiver RC-Glieder bestimmt (siehe Abb. 18).

Es kann hier nicht jeder einzelne Schritt des Programms ausführlich beschrieben werden. Stattdessen soll an einem Einzelbeispiel dargelegt werden, wie getroffene Annahmen schaltungstechnisch verwirklicht wurden.

Entsprechend den oben entwickelten Grundannahmen bestimmt die Menge des "freien" sarkoplasmatischen Calciums (c -Kompartiment) Ausmass und Verlauf der kontraktile Antwort, wobei folgende zusätzliche Annahmen gemacht werden müssen:

- 1) Es soll eine Ca^{2+} -Schwellenkonzentration für die kontraktile Aktivierung existieren.
- 2) Ein integrierender Schritt soll die gesamte Reaktionskette zwischen Calciumfreisetzung und mechanischer Energieübertragung repräsentieren.

Der umrandete Bezirk der Abb. 19 (rechts oben) zeigt, wie diese Annahmen schaltungstechnisch verwirklicht wurden. Der Experimentator stellt am Potentiometer (P) den gewünschten Schwellenwert ein, den das Eingangssignal ($-c$) mindestens erreichen muss, um als $-c^\ominus$ fortgeleitet zu werden. Durch eine Offsetschaltung (hier 0.1 Recheneinheiten) wird die Basislinie von $-c^\ominus$ auf Null zurückgestellt und das Ausgangssignal $-c^\ominus$ durch den Integrierer (INT) jeweils integriert und invertiert. Das Ausgangssignal bildet das Kontraktionsanalogon.

3.2.4 Die Einstellung des Analogmodells

Falls das Modell hinsichtlich der elektromechanischen Kopplungsprozesse des Herzens physiologische Relevanz besitzt, so muss sich eine genau definierte Einstellung der Parameter finden lassen, bei der das Modell unter wechselnden Arbeitsbedingungen sich genau wie die lebende Herzmuskelzelle verhält. Die Einstellung der Parameter kann am programmierten Modell auf drei Ebenen erfolgen:

- 1) An den Charakteristiken der potentialabhängigen Koeffizienten β und γ und der Variablen d , f und l ,
- 2) an den Werten der Reaktionskonstanten k_0 bis k_{13} ,
- 3) an den Zeitkonstanten τ_a , τ_i und τ_r .

Die Werte aller Parameter müssen sich auf physiologische Daten gründen. In den Fällen, in denen noch keine experimentellen Ergebnisse zu Grunde gelegt werden können, müssen vernünftige, d.h. begründbare Grössenordnungen gewählt werden. Eine genaue Einstellung erfordert daher weitere implizite Prämissen, die hier nur an einem Beispiel diskutiert werden sollen:

Bisher gibt es keine experimentellen Daten über die in vivo Kinetiken der Calciumabgabe aus den Speicherorten des sarkoplasmatischen Retikulums. Es ist jedoch anzunehmen, dass dieser Vorgang - vermutlich durch autoregenerative Prozesse beschleunigt - sehr schnell abläuft und in kritischer Weise vom Membranpotential abhängt. Folglich wurde k_4 mindestens eine Grössenordnung höher gewählt als die Reaktionskonstante k_6 , die den Calciumausstrom aus den Mitochondrien bestimmt.

Nach der ersten groben Einstellung wurde das Modell in Betrieb genommen und sein von der lebenden Herzmuskelzelle abweichendes Verhalten entsprechend korrigiert. Das folgende Kapitel zeigt, dass die Gesamteinstellung des Modells in

höchst zufriedenstellendem Masse gelang. Die in dieser Arbeit gezeigten Originalregistrierungen wurden alle bei derselben Optimaleinstellung aufgezeichnet, deren Werte in Tabelle 1 zusammengestellt sind.

REAKTIONSKONSTANTEN k													
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0.2	2.1	8	2.3	10	0.8	0.1	0.5	3.2	2.5	1	7	0.3	0.1

ZEITKONST. τ (ms)		
a	i	r
10	30	250

Tab. 1

Bei allen Versuchen, die im folgenden Kapitel beschrieben werden, waren die Computerpotentiometer entsprechend diesem Muster eingestellt.

Entsprechend den aufgestellten Postulaten (siehe Gleichung (3) in Kapitel 3.2.1) wurden zur Beschreibung des langsamen transmembranären Einwärtsstromes drei in Serie geschaltete potentialabhängige Elementarprozesse programmiert, deren kinetisches Verhalten den zeitlichen Verlauf der Leitfähigkeit der Myokardzellmembran für Ca^{2+} bestimmen. In der Abb.20 sind typische Registrierbeispiele von verschiedenen Ausgangssignalen wiedergegeben, die dieser Modellteil als Antwort auf (depolarisierende und repolarisierende) Rechteckimpulse an den Eingängen der Funktionsgeneratoren liefert. Betrachtet man den zeitlichen Ablauf der Leitfähigkeit des langsamen Membrankanals (d.f.1), so wird deutlich, dass die schnelle Zunahme der Membranleitfähigkeit bei Depolarisation

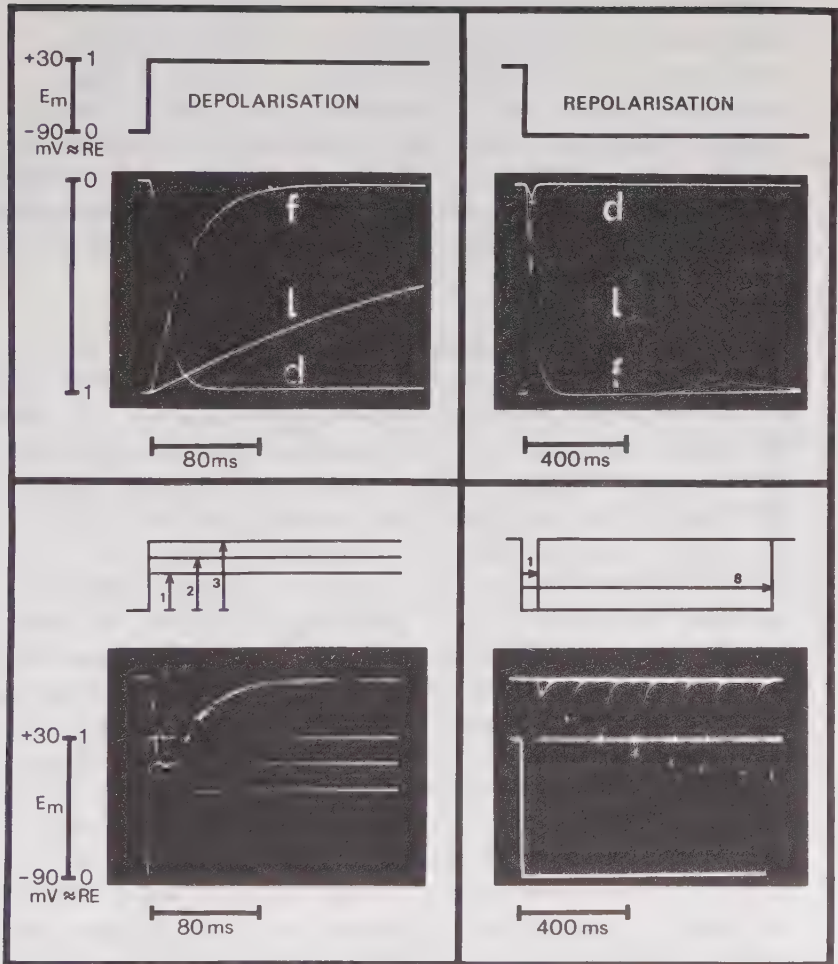


Abb. 20: Zeitliches Verhalten der Variablen (d, f, l) im Analogmodell des langsamen Einwärtsstromes bei Depolarisation (links oben) und Repolarisation (rechts oben). Zeitlicher Verlauf des resultierenden Produktes ($d \cdot f \cdot l \approx I_{Ca}$) bei Depolarisationsschritten unterschiedlicher Höhe (links unten). Darstellung des zeitlichen Verlaufs der "recovery" (rechts unten). Versuchsablauf siehe Insets.

(Aktivierung) durch das kinetische Verhalten der Variablen d bestimmt wird (linker Bildteil in Abb. 20). Die etwas langsamere Abnahme der Leitfähigkeit (Inaktivierung) beruht dagegen auf dem Verlauf von f . Die sehr langsame Kinetik der Inaktivierungsvariablen l wird durch die schnellere Kinetik von f überspielt. Nach Repolarisation (rechter Bildteil in Abb. 20) kontrolliert jedoch der sehr langsame Verlauf der Inaktivierungskonstanten l die Membranleitfähigkeit bei erneuter Depolarisation. Die Kinetik der Variablen l bestimmt damit die Zeitkonstante der "recovery from inactivation".

Betrachtet man die Ausgangssignale, die das Modell der elektromechanischen Koppelung als Antwort auf Aktionspotentiale an den Eingängen der Funktionsgeneratoren liefert, so fällt auf, dass noch lange nach Kontraktionsende dynamische Veränderungen im Calciumspeicher- und Abgabesystem zu beobachten sind (Abb. 21). Der Calciumgehalt des l -Kompartimentes erreicht bei dieser Einstellung des Modells (Werte siehe Tab. 1) erst 15-20 Sekunden nach Reiz eine typische steady state Kontraktion, die während einer längeren Ruheperiode bestehen bleibt. Diese steady state-Konzentration wird nur von den Geschwindigkeitskonstanten des potentialunabhängigen transmembranären Calciumeinstroms in Ruhe $0k_0$ und dem potentialabhängigen Ruhe-Efflux $\beta^1 k_{11}$ bestimmt. Abb. 21 zeigt weiterhin, dass bei jedem Aktionspotential von mindestens 60 msec Dauer fast das gesamte Speichercalcium aus dem l -Kompartiment ausströmt. Es wird wieder gefüllt, sobald der Repolarisationsgrad der Membran den Calciumtransport vom Aufnahmekompartiment (f) in das Speicherkompartiment (l) zulässt. Die Calciumkonzentration des l -Kompartiments steigt nach dem Sistieren einer rhythmischen Erregung in den ersten zwei Sekunden nach Beendigung der Repolarisationsphase auf ein Maximum an. Die Höhe dieses Maximums ist durch das vorhergegangene Reizmuster determiniert und zeigt je nach Füllungsgrad

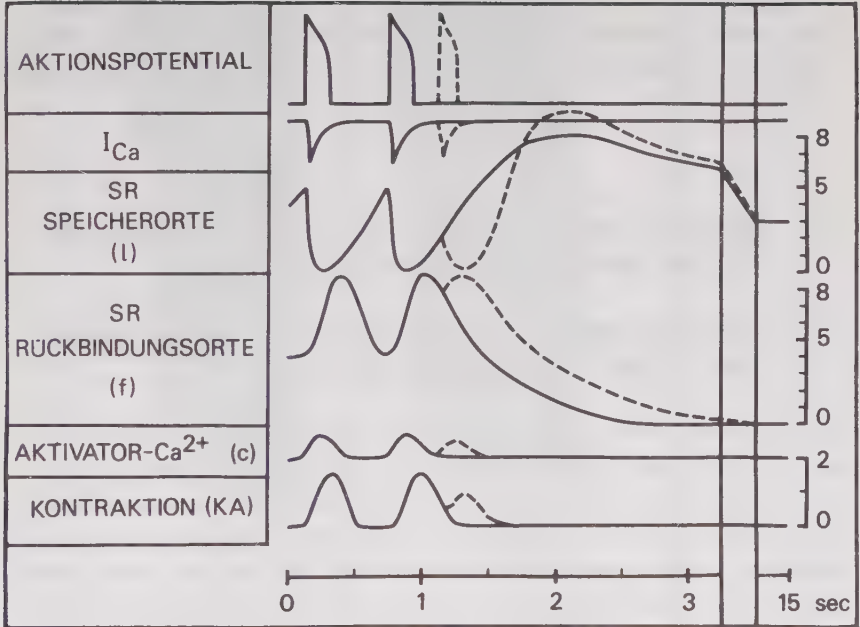


Abb. 21: Registrierbeispiel des dynamischen Verhaltens des Analogmodells der elektromechanischen Koppelung. Nach repetitiver Aktivierung - bzw. nach Auslösung einer Extrasystole (gestrichelte Linien) - wurde die Reizung unterbrochen und die dynamischen Veränderungen im Speicher- und Rückbindungssystem aufgezeichnet.

des 1-Kompartiments während der vorangegangenen rhythmischen Erregung das Bild eines mehr oder minder starken "overshoots", d.h. einer kurzzeitig überschüssenden Calciumkonzentration im Speicherkompartiment. Während der folgenden 15-20 Sekunden sinkt dann die Calciumkonzentration langsam auf ein steady state-Niveau. Es ist bemerkenswert, dass dieser Konzentrationsabfall nicht linear verläuft, sondern in Abhängigkeit von den vorhergegangenen Aktivierungsbedingungen mehr oder weniger ausgeprägte Oszillationen aufweist (siehe auch Abb. 25).

3.3 VERGLEICH DER KONTRAKTILEN MUSTER DES ANALOGMODELLS MIT DEM VERHALTEN DES LEBENDEN MYOKARDS

3.3.1 Die Amplituden-Frequenzbeziehung und Treppenphänomene nach Wechsel der Reizfrequenz

Abb. 22 zeigt die Amplituden-Frequenzbeziehung des Modells im Vergleich mit dem entsprechenden Verhalten eines isolierten Katzenpapillarmuskels bei Reizfrequenzen zwischen 6/min und 60/min ($(\text{Ca}^{2+})_o$ 2.5 mM, 31°C). Danach ist offensichtlich, dass das Modell auf Frequenzänderungen im wesentlichen genauso wie der lebende Muskel reagiert. Es beschreibt sowohl die Kontraktionsamplituden unter steady state Bedingungen als auch die schnellen Treppenphänomene nach jeder plötzlichen, stufenförmigen Änderung der Reizfrequenz in genau der gleichen Weise, wie sie im lebenden Herzmuskel ablaufen. Das Modell zeigt dagegen nicht die leichte Biphasizität der Treppe, wie sie in der lebenden Herzmuskelzelle häufig beobachtet wird (KOCH-WESER und BLINKS, 1963; BFNEKEN und De WIT, 1967; SCHAEFER und Van ZWIETEN, 1971; BAYER, KAUFMANN und GUDJONS, 1977). Zum derzeitigen Zeitpunkt können wir nicht entscheiden, ob dieser geringen Abweichung des Com-

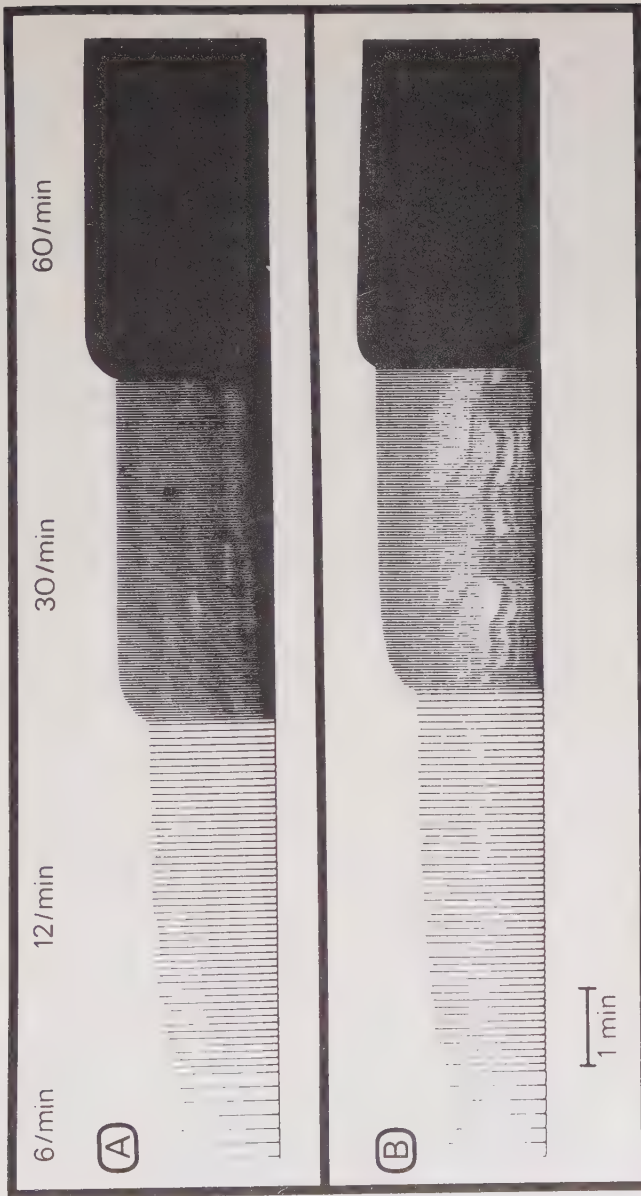


Abb. 22: Originalregistrierungen von Amplituden-Frequenzbeziehungen. Gegenüberstellung des Verhaltens des Analogmodells (A) zu dem eines Katzenpapillarmuskels (B). Die Reizfrequenz wurde schrittweise von 6/min auf 12, 30 und 60/min erhöht. In dem untersuchten Frequenzbereich wird jede plötzliche Frequenzsteigerung mit einem treppenförmigen Ansteigen der Kontraktionsamplituden beantwortet, bis nach 8-12 Schlägen ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht ist.

puterverhaltens Calciumbewegungen zugrunde liegen, die im Analogmodell nicht programmiert sind, oder ob die Biphasizität der Treppe durch Ausschüttung adrenerger Überträgersubstanzen im Muskelpräparat bedingt ist.

Abgesehen von der Biphasizität der Treppe ist es recht einfach, die Amplituden-Frequenzbeziehung mit Hilfe des Modells zu erklären: Im programmierten Modell arbeitet das intrazelluläre Calciumspeicher- und -abgabesystem wie ein Calciumreservoir. Lässt man den Calciumeinstrom in Ruhe (0k_o) zunächst einmal ausser Betracht, so ist der Füllungsgrad des l-Kompartiments durch das Zeitintegral des transmembranären Calciumeinstroms über die Dauer aller Aktionspotentiale bestimmt. Er wird um das Zeitintegral des transmembranären Calciumausstroms über die gesamte Dauer der diastolischen Intervalle vermindert. Mit zunehmender Reizfrequenz steigt das Zeitintegral des Calciumeinstroms, während das Zeitintegral des Ausstroms abnimmt. Bei höheren Reizfrequenzen muss folglich der durchschnittliche Füllungsgrad des l-Kompartiments und - in enger Korrelation dazu - die Kontraktionsamplitude ansteigen.

Das Integrationsvermögen des Systems erklärt auch die einfachen monophasischen Treppenphänomene nach stufenförmigen Änderungen der Reizfrequenz in niedrigen und mittleren und den kurzzeitigen Amplitudenabfall bei Umschalten in hohe Reizfrequenzbereiche. Sowohl der lebende Papillarmuskel als auch das Modell reagieren auf einen plötzlichen Anstieg der Reizfrequenz von beispielsweise 30/min auf 60/min mit einem kurzen, vorübergehenden Abfall der Kontraktionsamplitude und einer anschliessenden positiven Treppe. Die Erklärung dieses komplexen Kontraktionsverhaltens bei hohen Reizfrequenzen wird in der folgenden Diskussion gegeben, in der die Reaktion des Modells auf extrasystolische Reizmuster besprochen werden.

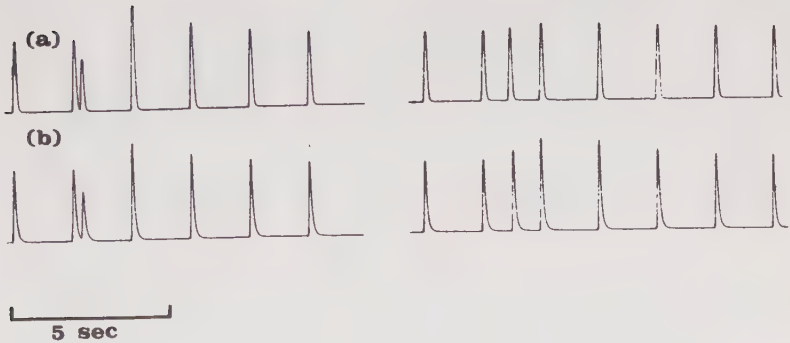
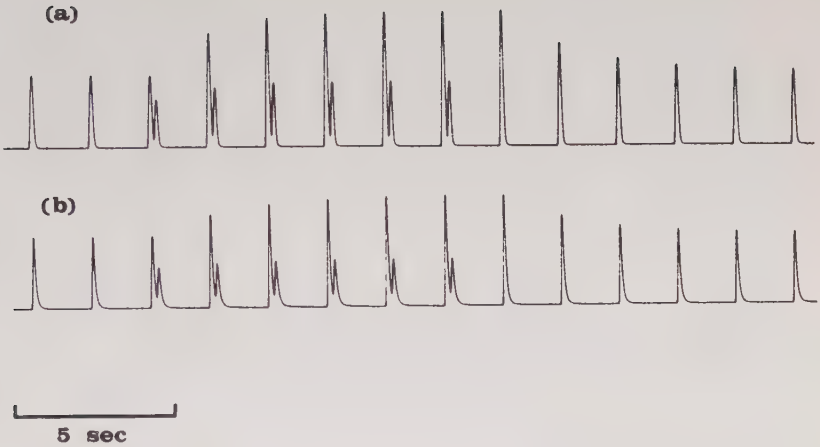


Abb. 23: Kontraktilen Verhalten eines isolierten Katzenpapillarmuskels (a) auf unterschiedliche extrasystolische Reizmuster ($(\text{Ca}^{2+})_o$ 2.5 mM) im Vergleich mit den Computergegebnissen, die unter denselben Erregungsbedingungen erhalten wurden (b).

3.3.2 Die postextrasystolische Potenzierung

Abb. 23 zeigt, wie das Modell im Vergleich mit dem lebenden Herzmuskel auf verschiedene extrasystolische Reizmuster reagiert. Auch hier findet sich eine eindeutige Übereinstimmung im charakteristischen Verhalten, wenn auch einige geringe quantitative Unterschiede im Ausmass der postextrasystolischen Potenzierung bestehen. Es kann jedoch kein besseres Ergebnis erwartet werden, da die gezeigten Effekte an lebenden Papillarmuskeln in sehr weiten Grenzen individuell schwanken.

Zur Erklärung der charakteristischen Extrasystolenmuster muss noch einmal auf die Abb. 21 zurückgegriffen werden: Während kontinuierlicher rhythmischer Erregung hängt die Amplitude einer einzelnen Kontraktion offensichtlich von dem Füllungsgrad des 1-Kompartiments ab, den es im Verlauf der Diastole erreicht hat. Wenn nun sehr kurz nach Ende einer Kontraktion ein Extrareiz gesetzt wird, so hat der Calciumgehalt des 1-Kompartiments noch nicht die Höhe erreicht, die er zum Zeitpunkt des regulären Schlages erreicht haben würde. Folglich hat die aus dem Extrareiz resultierende Extrasystole eine wesentlich geringere Amplitude als der reguläre Schlag. Wenn umgekehrt der Zeitraum zwischen dem regulären Schlag und der Extrasystole verlängert wird, muss folgerichtig die Amplitude der Extrasystole zunehmen.

In beiden Fällen bringt aber die Extraerregung eine zusätzliche "transmembranäre" Calciummenge in das intrazelluläre System. Zwar verteilt sich dieses Calcium grundsätzlich auf alle Kompartimente, jedoch fliesst der grösste Teil in das Speichersystem des SR. Die Calciumkonzentration steigt daher im 1-Kompartiment nach einer Extrasystole stärker an und erreicht zum Zeitpunkt des nächsten regulären Reizes einen

höheren Wert als vorher, d.h. der postextrasystolische Schlag ist verstärkt, vorausgesetzt der zeitliche Abstand zur vorhergehenden Extrasystole ist nicht zu gering. Das ist dann der Fall, wenn die Extrasystole sehr spät in die Diastole (z.B. 30 msec vor dem regulären Reiz) fällt. Hier ist der reguläre Schlag nicht erhöht, sondern seine Amplitude ist eher verkleinert, weil die Zeit, die zwischen Extrasystole und regulärem Schlag zur Wiederauffüllung des l-Kompartiments zur Verfügung steht, zu kurz ist, um eine ausreichende Füllung zu gestatten.

Zusammengefasst: Das Modell erklärt sowohl die Amplituden-Intervallbeziehung einer Extrasystole nach einem regulären Schlag als auch die Amplituden-Intervallbeziehung eines regulären Schlages nach einer Extrasystole.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann man auch den in 3.3.1 bereits erwähnten kurzfristigen Abfall der Kontraktionsamplitude verstehen, der nach plötzlicher Erhöhung der Reizfrequenz im höheren Frequenzbereich auftritt. Der erste Schlag nach einem Frequenzsprung kann im Vergleich zur vorhergehenden langsamen Reizfrequenz als eine Extrasystole betrachtet werden. Wenn die Frequenz so hoch ist, dass das l-Kompartiment sein Füllungsmaximum nicht mehr erreichen kann, wird sich das verkürzte Reizintervall zuerst in einem erniedrigten Calciumgehalt des l-Kompartimentes zum Zeitpunkt des Reizes widerspiegeln und die Amplitude des folgenden Schlages wird abgeschwächt. Wenn nun die höhere Reizfrequenz bestehen bleibt, so steigt die transmembranäre Calciumversorgung zeitintegriert über die Gesamtdauer aller Aktionspotentiale an. Infolgedessen nimmt auch der Calciumgehalt im l-Kompartiment allmählich zu, sodass mehr Calcium für jede einzelne Kontraktion zur Verfügung steht. Schliesslich erreicht das Gesamtsystem nach ca. 8-10 Schlägen einen neuen Gleichgewichtszustand. Aus diesem Verhalten resultiert eine positive Treppe.

3.3.3 Die Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen

Am lebenden Ventrikelmyokard von Warmblütern lassen sich weiterhin charakteristische biphasische "Transients" beobachten, wenn nach einer Ruheperiode die rhythmische Reizung wieder einsetzt. Dauert das Ruheintervall nicht länger als 5 - 10 Sekunden, so ist der 1. Schlag im Vergleich zu den vorangegangenen steady state-Amplituden erhöht und der 2. Schlag abgeschwächt. Die Amplituden der dann folgenden Schläge bilden eine positive Treppe, bis nach etwa 8 - 10 Kontraktionen die steady state Ausgangsamplitude wieder erreicht wird.

Führt man bei solchen Experimenten eine Analyse der Amplituden-Intervallbeziehung für den ersten Schlag nach einer Pause durch (Amplituden-Pausenbeziehung), so ergibt sich folgendes: Bei Verlängerung der Pausenzeit steigt die Amplitude des ersten Schlages zunächst an und erreicht (je nach Muskeltyp und Arbeitsbedingungen) ein Maximum nach Pausen von 2-6 Sekunden. Bei weiterer Verlängerung der Reizpausen nimmt die Kontraktionsamplitude des ersten Schlages wieder ab und erreicht bei Pausenzeiten von 10-20 Sekunden ein steady state.

Abb. 24 zeigt, dass das Modell in genau der gleichen Weise reagiert. Auch hier lässt sich das Verhalten am besten verstehen, wenn man die dynamischen Veränderungen im 1-Kompartiment betrachtet. Wie schon oben erwähnt, schließt der Calciumgehalt des 1-Kompartiments nach Abbruch einer rhythmischen Erregung zunächst über diejenige Konzentration hinaus, welche während der vorangegangenen rhythmischen Erregung jeweils zum Kontraktionsbeginn erreicht war. Ein Maximum der Füllung wird offensichtlich nach 2-3 Sekunden erreicht. Anschliessend kommt es zu einer langsamen Kontraktionsabnahme,

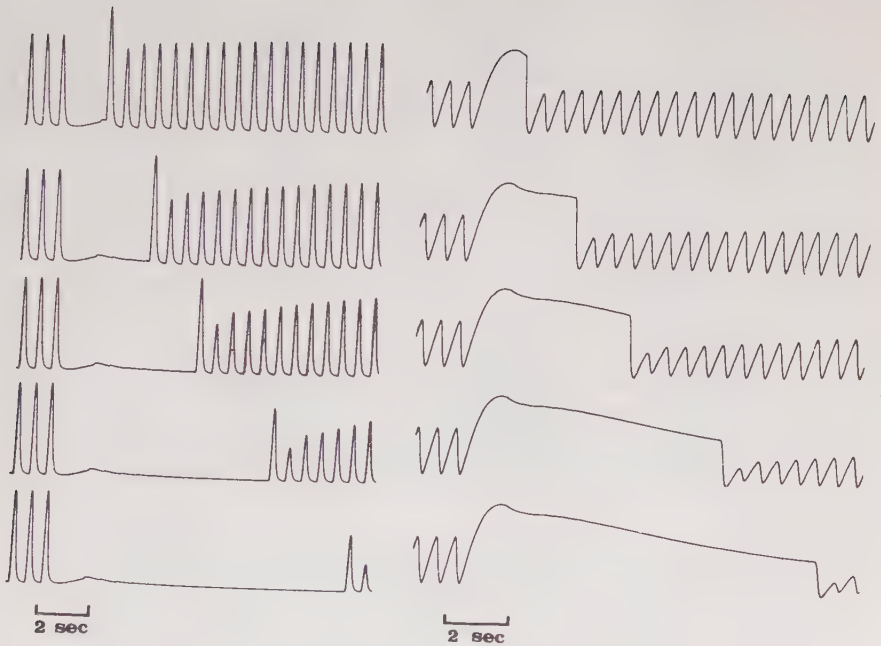


Abb. 24: Amplituden-"Transients" nach unterschiedlich langen Ruheperioden. Die linke Seite der Abbildung zeigt Kontraktionsanaloge, die rechte Seite die entsprechenden Füllungsdynamiken des 1-Kompartimentes.

die üblicherweise in Form einer stark gedämpften Schwingung erfolgt (siehe auch Abb. 21). Dieser Verlauf der instantanen Calciumfüllung im 1-Kompartiment bestimmt bei Wiederbeginn der Reizung die Amplitude der 1. Kontraktion. Die Abschwächung des 2. Schlages und die darauffolgende positive Treppe sind dagegen wieder Ausdruck des Calcium-Integrationsvermögens des Speicher- und Abgabesystems.

Wie Abb. 25 zeigt, werden die dynamischen Veränderungen des Speichercalciums im 1-Kompartiment unter anderem von $(Ca^{2+})_o$ beeinflusst. $(Ca^{2+})_o$ wurde hier um den Faktor 2 bzw. 3 erhöht. Dadurch wird die Calciumzufuhr auf transmembranärem Weg gesteigert. Dies bewirkt nicht nur den erwarteten positiv inotropen Effekt, sondern auch typische Veränderungen in der Füllungsdynamik des 1-Kompartiments nach Abbruch der rhythmischen Erregung. Wenn die extrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt, werden im einzelnen folgende Phänomene beobachtet:

- 1) Die Anstiegszeit bis zum "Overshoot", d.h. bis zur maximalen Calciumkonzentration im 1-Kompartiment ist verkürzt.
- 2) Die Neigung zu Oszillationen während des anschliessenden Abfalls der Calciumkonzentration ist verstärkt.

Besonders auffällig ist, dass sich die oszillatorischen Konzentrationsschwankungen im Speicher- und Abgabesystem mit zunehmendem $(Ca^{2+})_o$ immer deutlicher in kontraktile Antworten als sogenannte "Nachkontraktionen" ausprägen. Auch am isolierten Warmblütermyokard werden unter genau denselben Bedingungen solche "Nachkontraktionen" beobachtet (PEETER, 1962; KAUFMANN, FLECKENSTEIN und ANTONI, 1963).

Wenn die Annahme richtig ist, dass die Stärke einer Einzelkontraktion der Warmblütermyokardzelle vorwiegend von der verfügbaren Calciummenge im 1-Kompartiment bestimmt wird, muss man auch am lebenden Präparat die oben geschilderten

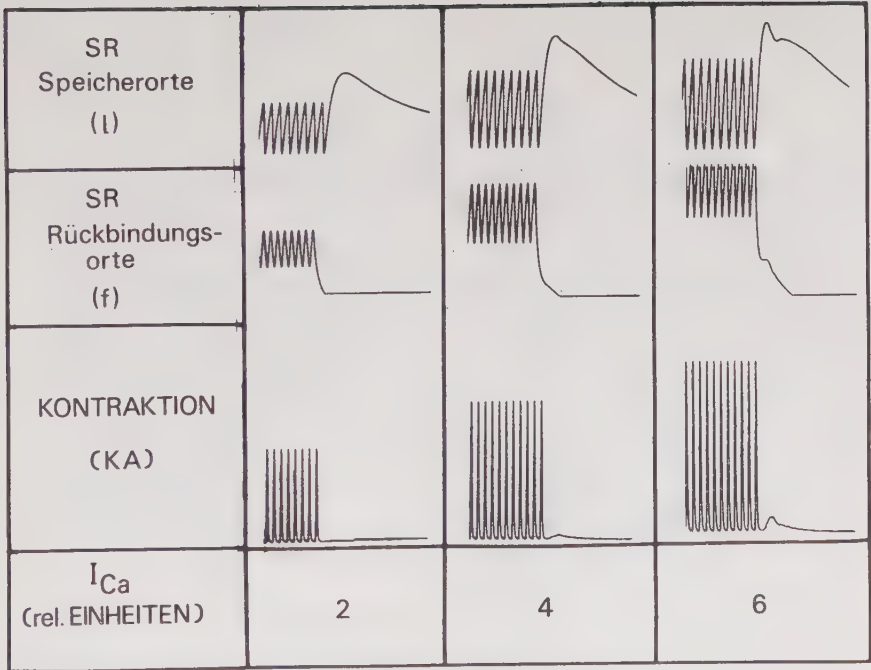


Abb. 25: Dynamische Änderungen im Speicher- und Rückbindungssystem des Modells nach Abbruch der rhythmischen Aktivierung. Der transmembranäre Calciumeinstrom (k_1 und k_7) wurde um den Faktor 2 (mittlerer Bildteil) bzw. 3 (rechter Bildteil) erhöht. Man beachte das zunehmend oszillatorische Abklingen der Calciumfüllung im l-Kompartiment und das Auftreten von sogenannten Nachkontraktionen.

Zusammenhänge zwischen $(Ca^{2+})_o$ und Veränderungen in der Amplituden-Pausenbeziehung finden. Die Abb. 26 zeigt die Amplituden-Pausenbeziehung des Modells im Vergleich zum entsprechenden Verhalten des Katzenpapillarmuskels. Danach wird deutlich, dass sich das Modell unter Normalbedingungen und bei Erhöhung der transmembranären Calciumzufuhr im wesentlichen wie das lebende Myokard verhält.

3.3.4 Die Beziehung zwischen Erregung und Kontraktion

Änderungen der elektrischen Parameter, besonders der Aktionspotentialdauer, bewirken an isolierten Herzmuskelpräparaten von Säugetieren typische treppenartige mechanische Antworten (WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969; ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969). Die beobachteten mechanischen Antworten sind allerdings nicht Ergebnisse von Veränderungen eines einzelnen mechanischen Parameters, z.B. der Gipfelspannung. Es sind vielmehr mindestens zwei voneinander unabhängige mechanische Parameter daran beteiligt, nämlich dp/dt und die Anstiegszeit zur Gipfelspannung (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969).

Wird beispielsweise die Aktionspotentialdauer eines rhythmisch gereizten Herzmuskels plötzlich verlängert, so ist beim ersten Schlag die Zeit bis zum Erreichen der Gipfelspannung verlängert; die Geschwindigkeit der Spannungsentwicklung (dp/dt) bleibt jedoch zunächst unverändert. Während der folgenden 8-10 Schläge bildet sich dann eine positive Treppe aus, die in erster Linie auf einem erhöhten dp/dt bei unveränderter Gipfelzeit beruht. Diese Art von Experimenten, vor allem aber neuere Analysen der mechanischen Aktivität unter

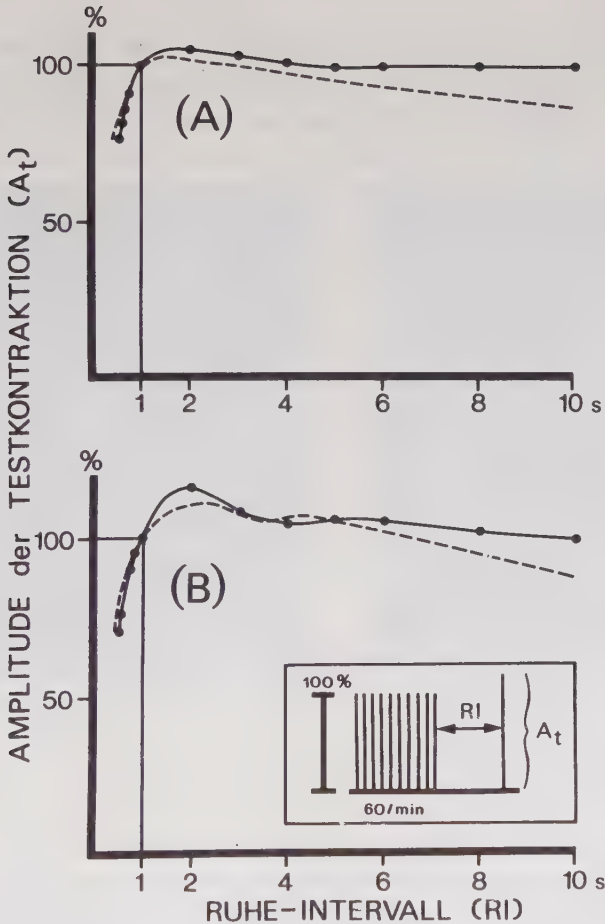


Abb. 26: Amplituden-Pausenbeziehung des Modells (gestrichelte Linien) und eines Katzenpapillarmuskels (durchgezogene Linien) unter Gleichgewichtsbedingungen. Die rhythmische Erregung (60/min) wurde unterbrochen und ein Testreiz zu unterschiedlichen Zeiten nach dem letzten regulären Schlag gesetzt. Die Amplitude der Testkontraktion wurde auf die der steady state Kontraktion (=100%) bezogen. Die Abszisse bezeichnet die Dauer der Pause zwischen dem Ende des letzten regulären Schläges und dem Testreiz (Versuchsablauf siehe auch Inset). Die Versuchsergebnisse vom Papillarmuskel wurden bei einem $(Ca^{2+})_0$ von 2.5 mM (A) und 7.5 mM (B) gewonnen. Im Modell wurde der I_{Ca} (k_1 und k_7) um den Faktor 3 erhöht.

voltage clamp-Bedingungen (FOZZARD und HELLMAM, 1968; BEELER und REUTER, 1970c; GOTO, KIMOTO und KATO, 1971) machen deutlich, dass beim Myokard die funktionelle Verknüpfung zwischen Erregung und Kontraktion nur in einem vielparametrischen Potential-Zeitgefüge beschrieben werden kann (siehe 3.1). Dieses ist seinerseits wiederum abhängig von der Spezies des Versuchstieres sowie einer Vielzahl experimenteller Randbedingungen (Temperatur, extrazelluläre Ionenkonzentration, Pharmakawirkung, siehe 3.4 und 3.5)

Im Folgenden soll anhand einiger Beispiele gezeigt werden, dass das Modell zumindest die wesentlichen Merkmale der im Experiment bestimmten Potential-Kraft-Zeitbeziehung (siehe 3.1.4) des lebenden Herzmuskels beschreibt.

Abb. 27 zeigt Originalregistrierungen aus einem Versuch, bei dem das Modell rhythmisch mit einer Frequenz von 30/min aktiviert wurde. Wird hier nun die Aktionspotentialdauer plötzlich um etwa 20% verlängert, so steigt die Amplitude des ersten Schläges nach der Aktionspotentialverlängerung leicht an. Ursache hierfür ist, dass - in Übereinstimmung mit dem Verhalten des lebenden Myokards - die Gipfelspannung bei unverändertem dP/dt später erreicht wird. Während der folgenden Schläge nimmt nun die Kontraktionsamplitude weiterhin zu; diese Zunahme ist jetzt aber allein das Ergebnis einer treppenförmigen Vergrößerung von dP/dt . Wird umgekehrt die Aktionspotentialdauer plötzlich verkürzt, so ist die Kontraktionsamplitude des ersten Schläges danach zunächst nur geringfügig erniedrigt, und zwar ausschliesslich infolge einer Abnahme der Gipfelzeit. Anschliessend erfolgt eine treppenförmige Verminderung der Amplitude, vorzugsweise durch Abnahme von dP/dt . Dieses Verhalten des Modells entspricht genau dem am lebenden Myokard beobachteten Reaktionsmuster bei plötzlichen Änderungen der Depolarisationsdauer, etwa durch kathodische oder anodische Strominjektion in ein isoliertes Myokardpräparat (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969).

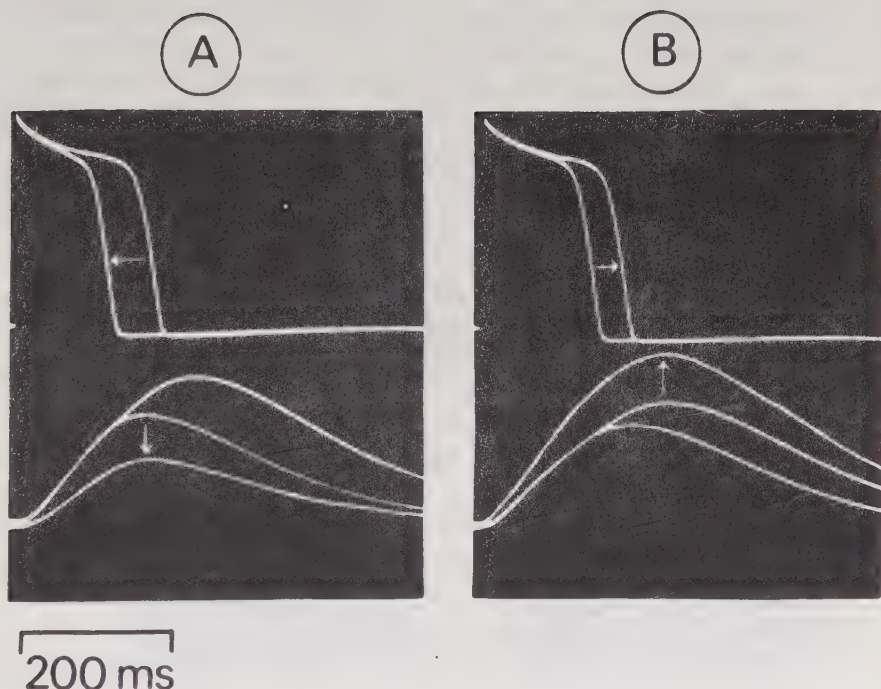


Abb. 27: Änderung im Zeitablauf der kontraktiven Antwort des Modells bei plötzlicher Verkürzung (A) oder Verlängerung (B) des Aktionspotentials (Reizfrequenz 30/min). In beiden Fällen findet sich beim ersten Schlag nach Änderung der Aktionspotentialdauer eine geringe Amplitudenänderung, die jedoch durch eine verkürzte (A) oder verlängerte (B) Gipfelzeit bedingt ist. Während der folgenden Schläge entwickelt sich dann eine negative (A) oder positive (B) Treppe (durch Pfeile angedeutet), die nun auf einer Änderung der Anstiegssteilheit beruht. Nach etwa 8-10 Schlägen wird ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht. In den Abbildungen sind nur die folgenden Einzelzyklen übereinander geschrieben: (1) Kontrollbedingungen, (2) erster Kontraktionszyklus nach Änderung der Aktionspotentialdauer, (3) Kontraktion nach Erreichen der neuen steady state Kontraktion.

Genauere Aufschlüsse über das Funktionsgefüge elektrischer und mechanischer Parameter bei der elektromechanischen Kopplung können - wie anfangs (3.1) dargelegt - mit Hilfe der voltage clamp-Technik gewonnen werden. Diese Technik erlaubt eine viel präzisere Beschreibung der mechanischen Parameter in ihrer Abhängigkeit von Membranpotential und Zeit als andere Methoden.

Derartige Versuche können am Analogcomputer durch Eingabe von Rechteckimpulsen anstelle von Aktionspotentialen simuliert werden. In dem in Abb. 28 gezeigten Experiment wurde die Abhängigkeit der kontraktiven Aktivität von der Dauer der diastolischen Repolarisationsphase einerseits und dem diastolischen Membranpotential andererseits untersucht. Diese beiden Grössen bestimmen, wie bereits mehrfach dargelegt (3.1.5; 3.2.1; 3.2.2) den Calciumtransport von den primären Rückbindungsstellen des SR (f) zu den Speicherorten des SR (l). Sie kontrollieren damit die aus dem SR freisetzbare Menge an Aktivator- Ca^{2+} . Die Abb. 28 macht deutlich, dass auch in dieser Hinsicht das Verhalten des Modells recht gut mit dem Verhalten des lebenden Warmblütermyokards übereinstimmt.

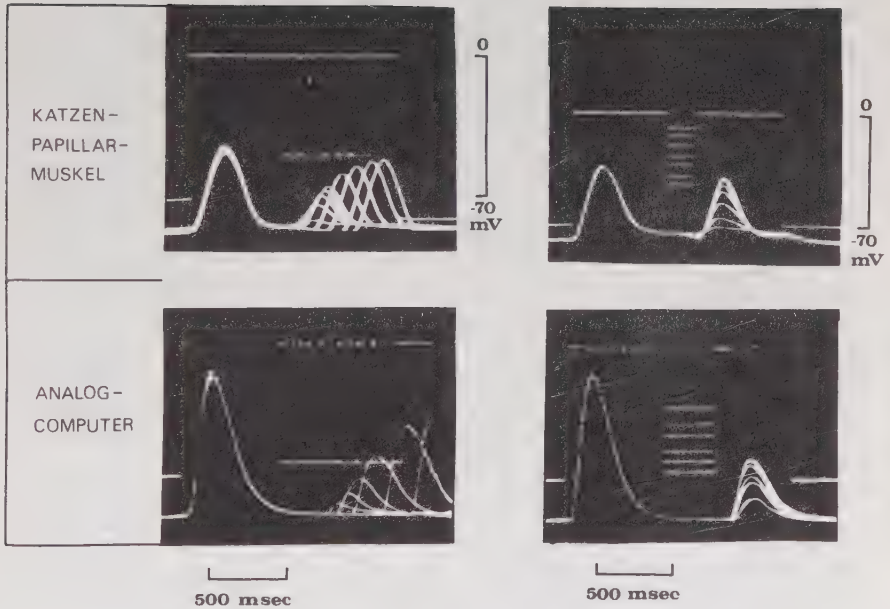


Abb. 28: Restitution des kontraktiven Systems nach verschiedenen interpolierten Repolarisationspotentialen (rechts) und unterschiedlicher Repolarisationsdauer (links). Das lebende Ventrikelmyokard (oberer Bildteil) und das Analogmodell (unterer Bildteil) verhalten sich prinzipiell gleich: Wird das Potential zwischen zwei Klemmschritten auf das Haltepotential zurückgeklemmt, so entspricht das Ausmass der kontraktiven Aktivierung infolge des zweiten depolarisierenden Klemmimpulses dem der ersten Kontraktion. Wird die Dauer zwischen zwei Klemmimpulsen verlängert, so nimmt die kontraktile Aktivierung zu (siehe dazu auch Abb. 12).

3.4 VERGLEICH DER INOTROPEN WIRKMUSTER VON VERAPAMIL, D 600, Ni^{2+} , La^{3+} UND PARTIELLEM Ca^{2+} -ENTZUG. UNTERSUCHUNGEN AM ISOLIERTEN KATZENPAPILLARMUSKEL

Die elektromechanische Koppelung des Herzens umfasst, wie in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargelegt, eine Vielzahl transmembranärer und subzellulärer Calciumbewegungen, die zum Teil in komplexer Weise miteinander verbunden sind. Betrachtet man andererseits die grosse Gruppe der Pharmaka, von denen man annimmt, dass sie primär den Ablauf der elektromechanischen Koppelung des Myokards verändern, so ist es leicht vorstellbar, dass sie an recht unterschiedlichen Punkten in das Wirkgefüge der elektromechanischen Koppelung eingreifen. Daher ist beim heutigen Wissensstand die einfache Feststellung, ein Medikament beeinflusse die elektromechanische Koppelung des Herzens (ohne weitere Spezifizierung, welcher der vielen Prozesse betroffen ist), sicher nicht zufriedenstellend. Das bedeutet auch, dass den üblichen Messgrössen, wie isometrische Gipfelspannung oder dP/dt (als Endprodukt aller Prozesse im Rahmen der elektromechanischen Koppelung), nur ein sehr beschränkter Aussagewert zukommt. Wirkunterschiede werden vielfach erst dann erkennbar, wenn ein möglichst vollständiges inotropes Wirkungsmuster eines Pharmakons bestimmt wird; wenn beispielsweise die Veränderungen folgender kontraktiler Ereignisse erfasst werden: Amplituden-Frequenzbeziehung im steady state, Amplituden-Pausenbeziehung, Treppenphänomene bei plötzlichem Frequenzwechsel, Kraft-Geschwindigkeits-Zeit- und Kraft-Geschwindigkeits-Längenbeziehung, Aktionspotential. Die Forderung nach einer ähnlich umfassenden Analyse kontraktiler Wirkmuster wurde schon von BLINKS und KOCH-WESER (1961, 1963) für die Untersuchung herzwirksamer Pharmaka erhoben. Aus der heutigen Sicht erscheint diese Wirkmusteranalyse noch attraktiver. Sie gibt uns nicht nur die Möglichkeit, Pharmaka, die in die elektromechanische Koppelung des Herzens eingreifen, formal zu klassifizieren, sondern auch Hinweise auf den oder die Wirkorte der Testsubstanz.

Die Zuordnung der jeweiligen Pharmakaeffekte zu mehr spezifischen Wirkorten ist jedoch aufgrund des komplexen Wirkgefüges der elektromechanischen Koppelung meist sehr schwierig. Der Einsatz eines Analogmodells der elektromechanischen Koppelung sollte eine solche Wirkortanalyse wesentlich erleichtern. Wie im vorangegangenen Kapitel (3.3) dargelegt, wird eine Vielzahl kontraktiler Phänomene durch die Betrachtung der im Analogmodell programmierten Calciumbewegungen zwischen den einzelnen zellulären und subzellulären Kompartimenten verständlich. Es soll daher der Versuch unternommen werden, die kontraktilen Wirkmuster unter Pharmakaeinwirkung durch gezielte Programmänderungen im Modell nachzubilden und anhand der veränderten Calciumbewegungen spezifische Wirkorte zu bestimmen.

Unter den neuentwickelten herzaktiven Pharmaka haben die sogenannten "Calciumantagonisten" besonderes Interesse gefunden. "Calciumantagonisten" sind nach einer Definition von FLECKENSTEIN (FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967; FLECKENSTEIN, 1971; FLECKENSTEIN, GRÜN, TRITTHART, BYON und HARDING, 1971) organische oder anorganische Verbindungen, die an der Myokardzelle und der glatten Muskelzelle den potentialabhängigen langsamen (Calcium-) Einwärtsstrom hemmen. Es wird angenommen, dass durch Drosselung der zellulären Ca^{2+} -Versorgung der intrazelluläre Calciumspiegel absinkt, sodass im Moment der Erregung weniger Aktivatorcalcium aus den intrazellulären Speichern des SR zur kontraktilen Aktivierung freigesetzt werden kann. Infolge des verringerten Ca^{2+} -Angebots an Troponin C (d.h. an das regulative Protein, das erst nach Anlagerung von Calcium die Aktin-Myosin-Interaktion ermöglicht) wird die Bildung von Aktomyosin gehemmt. (Zusammenfassende Darstellung siehe EBASHI, MASAKI und TSUKUI, 1974; EBASHI, OHTSUKI und MIHASHI, 1972; EBASHI und ENDO, 1968). Die Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion bewirkt nicht nur einen negativ inotropen Effekt, sondern führt auch (wegen

der ATPase Aktivität von Aktomyosin) zu einer Minderung der Utilisation energiereicher Phosphate (FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967). Die antianginöse Wirkung der organischen "Calciumantagonisten" bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit wird entsprechend der oben dargestellten zellulären Wirkmechanismen auf eine Reduktion des peripheren Widerstandes und eine direkte Minderung des myokardialen Energie- und Sauerstoffbedarfs zurückgeführt.

Keiner der Calciumantagonisten, die klinisch eingesetzt werden (Verapamil, Prenylamine, Nifedipine u.a.) ist bislang einer systematischen Analyse im oben genannten Sinne unterzogen worden. Die vorliegende Untersuchung umfasst die Analyse der inotropen Wirkmuster von Verapamil, einer calciumantagonistischen Substanz, die in grossem Umfang zur Therapie der koronaren Herzkrankheiten (HOFFMANN, 1968; KALTENBACH und ZIMMERMANN, 1968; NEUMANN und LUISADA, 1966; SANDLER, CLAYTON und THORNICROFT, 1968) und Tachyarrhythmien (zusammenfassende Darstellung siehe BELZ und BENDER, 1974) verwendet wird. Darüberhinaus soll durch Vergleich der inotropen Wirkmuster "klassischer" calciumantagonistischer Massnahmen (partieller Calciumentzug, Zugabe von Ni^{2+} , La^{3+}) demonstriert werden, dass ein für alle Calciumantagonisten gemeinsamer Wirkort bzw. Wirkmechanismus unwahrscheinlich ist.

3.4.1 Die Amplituden-Frequenzbeziehung und Treppenphänomene nach Wechsel der Reizfrequenz

Der Herzmuskel zeigt sowohl in vivo als auch in vitro, unter isometrischen und isotonischen Arbeitsbedingungen die bekannten Treppenphänomene nach plötzlichem Wechsel der Reizfrequenz (BOWDITCH, 1871; BLINKS und KOCH-WESER, 1961; ROSENBLUETH, ALANIS, RUBIO und LOPEZ, 1959; POSENBLUETH, ALANIS und RUBIO, 1959; LENDRUM, FEINBERG, BOYD und KATZ, 1960; zu-

sammenfassende Darstellung siehe KOCH-WESER und BLINKS, 1963). Die Kontrollregistrierung der Abb. 29 gibt den Verlauf der "Treppe" am isolierten Katzenpapillarmuskel wieder. Im Frequenzbereich von 6 - 60/min führt jede plötzliche Erhöhung der Reizfrequenz zu einer positiven Treppe. Diese ist dadurch charakterisiert, dass jeweils nach 6 - 10 Schlägen ein neuer Gleichgewichtszustand der isotonen Kontraktionsamplituden erreicht wird. Die steady state Amplitude, die bei jeder Reizfrequenz erreicht wird, bestimmt ihrerseits die Amplituden-Frequenzbeziehung.

Diesestypische Amplituden-Frequenzverhalten wird durch Verapamil und durch D 600 (Methoxyanalog von Verapamil) drastisch verändert (siehe Abb. 29): Unter der Einwirkung von 2 µg/ml Verapamil oder D 600 führt jede plötzliche Erhöhung der Reizfrequenz zu einer schnellen negativen Treppe, die etwa 8 - 12 Schläge andauert. Im Anschluss daran nehmen die Kontraktionsamplituden von Schlag zu Schlag geringfügig zu und erreichen dabei sehr langsam (zuweilen erst nach mehreren Minuten) ein neues Gleichgewicht. Die steady state-Amplitude ist umso stärker vermindert, je frequenter der Muskel stimuliert wird. Verapamil und D 600 führen also zu einer völligen Umkehr des Amplituden-Frequenzverhaltens; jede Reizfrequenzsteigerung bewirkt einen positiv inotropen, jede Reizfrequenzsenkung einen negativ inotropen Effekt. Eine solche Umkehr der Amplituden- bzw. Kraft-Frequenzbeziehung durch Verapamil ist kürzlich auch am perfundierten Kaninchenventrikel beschrieben worden (McCANS, LINDENMAYER, MUNSON, EVANS und SCHWARTZ, 1974).

Setzt man voraus, dass der negativ inotrope Effekt von Verapamil nur die Folge der Hemmung des potentialabhängigen langsamen Einwärtsstromes ist (FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967; FLECKENSTEIN, 1971; FLECKENSTEIN, GRÜN, TRITTHART, BYON und HARDING, 1971; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972), dann sollte man annehmen, dass auch eine

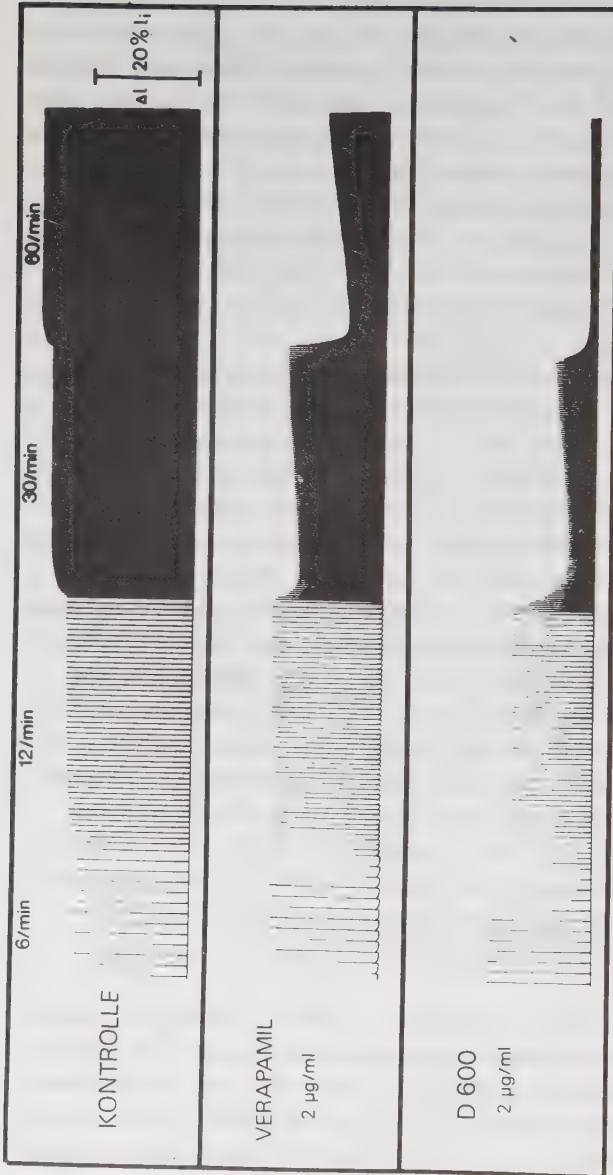


Abb. 29: Originalregistrierungen von Amplituden-Frequenzbeziehungen isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln. Unter Kontrollbedingungen wird jede plötzliche Erhöhung der Reizfrequenz im Bereich von 6 bis 60/min mit einer positiven Treppe beantwortet. Nach 6-10 Schlägen wird jeweils eine neue steady state Kontraktion erreicht. Unter Einwirkung von Verapamil und D 600 führt dagegen jede Frequenzerhöhung zuerst zu einer schnellen negativen Treppe, die von einem langsamen Wiederanstieg der Kontraktionsamplituden gefolgt wird. Die neue steady state-Amplitude ist dabei in jedem Fall niedriger als die, die während der vorausgehenden Reizperiode mit geringerer Reizfrequenz erreicht wurde.

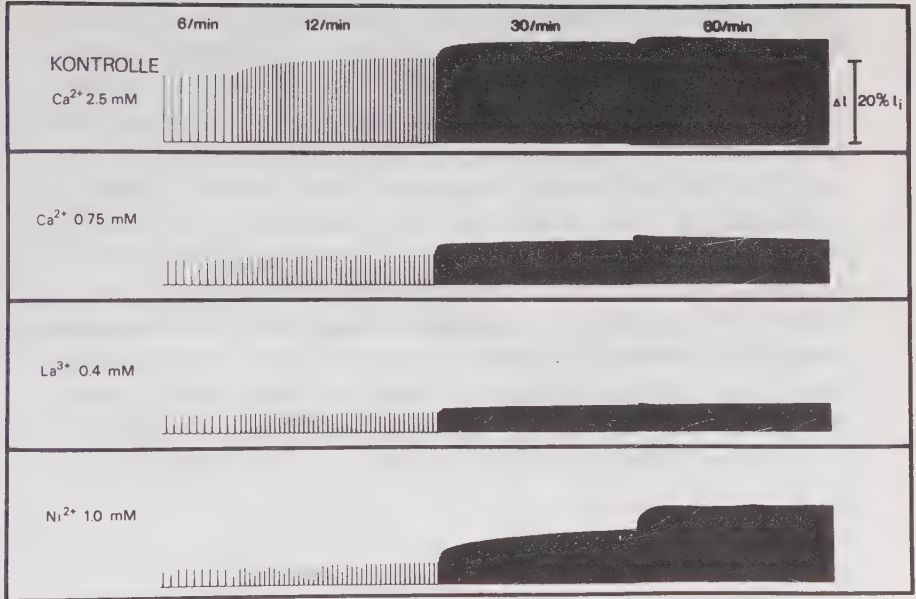


Abb. 30: Einfluss von partiellem Calciumentzug, Zugabe von La^{3+} oder Ni^{2+} auf die Amplituden-Frequenzbeziehung isolierter Katzenpapillarmuskeln unter isotonischen Kontraktionsbedingungen. Reduktion von $(\text{Ca}^{2+})_o$ und Zugabe von La^{3+} führen zu weitgehend Reizfrequenz-unabhängigen Abnahmen der Kontraktionsamplituden. Zugabe von Ni^{2+} senkt die Kontraktionsamplituden bei niedrigen Reizfrequenzen vergleichsweise stärker. Die transitorischen Treppenphänomene werden durch alle diese Massnahmen nur wenig beeinflusst.

Reduktion von $(Ca^{2+})_o$ oder die Zugabe von anderen calcium-antagonistischen Substanzen wie Ni^{2+} oder La^{3+} (KÖHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972; KATZUNG, REUTER und PORZIG, 1973) gleiche oder zumindest ähnliche Wirkungen auslösen.

Die Abb. 30 zeigt, dass dieses ganz offensichtlich nicht zutrifft. Solche Eingriffe bewirken zwar untereinander ähnliche inotrope Wirkmuster, sind jedoch verglichen mit dem Wirkbild des Verapamils oder D 600 völlig verschieden. Senkung von $(Ca^{2+})_o$ oder Zugabe von La^{3+} führen zu einer beinahe massigen Abnahme der steady state Amplituden bei allen Reizfrequenzen. Ni^{2+} scheint die steady state Amplituden bei niedriger Schlagfrequenz allerdings etwas stärker zu reduzieren als La^{3+} und partieller Calciumentzug (siehe auch Abb. 31A). Eine Erhöhung von $(Ca^{2+})_o$ vermag die Wirkung von Verapamil auf die Amplituden-Frequenzbeziehung nicht aufzuheben. Im Gegenteil: In Gegenwart einer hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt Verapamil eine noch stärkere Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung (Abb. 31B). Auch die charakteristischen Verapamil-induzierten Treppenphänomene wurden durch Variation von $(Ca^{2+})_o$ nicht verändert.

3.4.2 Die Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen

Weitere Analysen des inotropen Wirkmusters zeigten bestimmte Phänomene, die kaum mit einer alleinigen Hemmung des potentialabhängigen langsamen Einwärtsstromes (I_{Ca}) in Einklang zu bringen sind. Die Abb. 32 macht deutlich, dass Verapamil (5 µg/ml) bei hoher Reizfrequenz (60/min) eine nahezu vollständige elektromechanische Entkoppelung auslöst. Wird in dieser Situation die Reizfrequenz plötzlich auf 6/min reduziert, so nehmen die Kontraktionsamplituden in Form einer positiven Treppe ausserordentlich stark zu. Dabei fallen zwei Phänomene besonders auf:

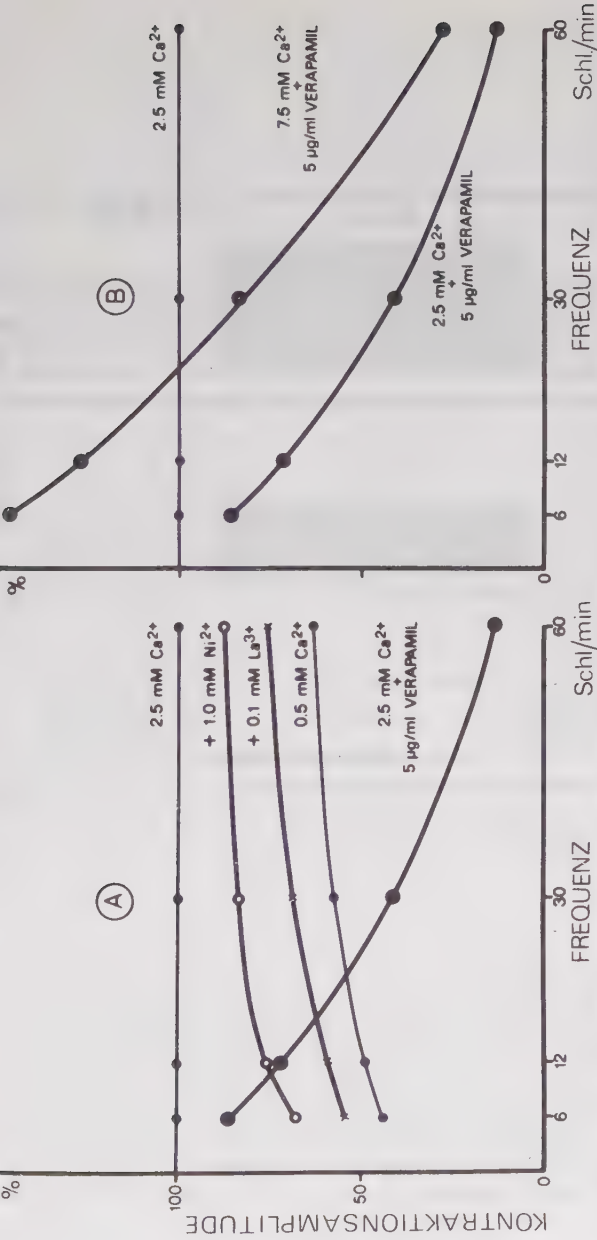


Abb. 31: Amplituden-Frequenzbeziehung für steady state Kontraktionen isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln (Frequenzbereich 6-60/min). Experimenteller Ablauf wie in den Originalregistrierungen der Abb. 29, 30 gezeigt. Die Änderungen der steady state Amplituden wurden für jede Reizfrequenz auf die Kontrollamplituden (jeweils = 100%) bezogen. Zugabe von Ni^{2+} oder La^{3+} und Reduktion von $(\text{Ca}^{2+})_0$ bewirken eine recht gleichmäßige Abnahme der Kontraktionsamplituden bei allen Reizfrequenzen (A). In deutlichem Gegensatz dazu wird die Amplituden-Frequenzbeziehung durch Verapamil umgekehrt (A). Erhöhung von $(\text{Ca}^{2+})_0$ kann diese Verapamilwirkung nicht aufheben: Zugabe von Extracalcium bewirkt bei niedrigen Reizfrequenzen einen vergleichsweise stärkeren positiv inotropen Effekt als bei hoher Aktivierungsfrequenz. Die Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung wird dadurch noch deutlicher (B).

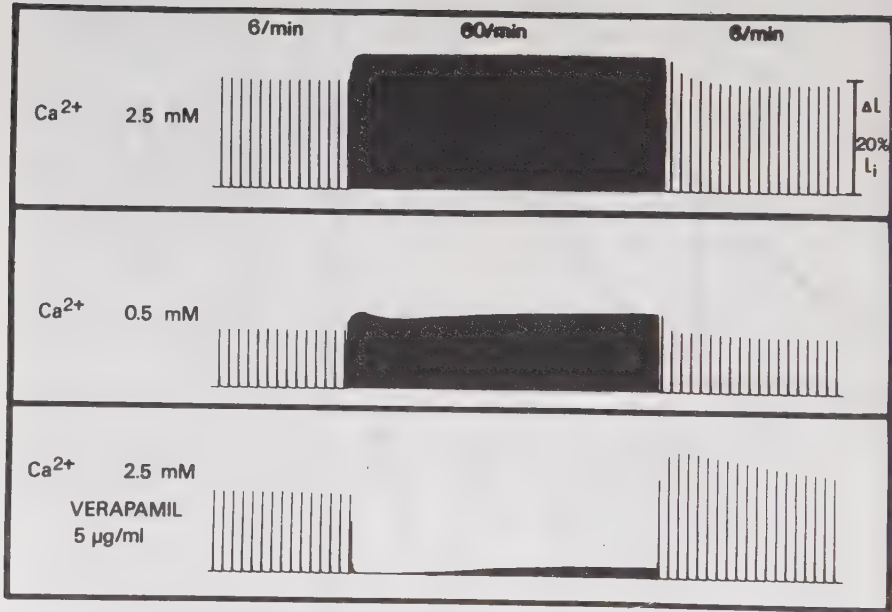


Abb. 32: Kontraktilen Verhaltensmuster eines isolierten Katzenpapillarmuskels bei plötzlicher Erhöhung der Reizfrequenz (für 4 min) von 6 auf 60/min und nach Zurückschalten auf 6/min. Gegenüberstellung der Effekte von partiellem Calciumentzug und Zugabe von Verapamil. Verapamil bewirkt bei 60/min eine nahezu vollständige elektromechanische Entkoppelung, die durch plötzliche Verlängerung des Reizintervalls sofort (1. Kontraktion !) aufgehoben wird. Wird die niederfrequente Reizung fortgesetzt, so übertreffen die Kontraktionsamplituden zeitweise die Kontrollwerte.

- 1) Bereits die erste Kontraktion nach dem verlängerten Reizintervall ist um ein Vielfaches (6 - 10fach) höher als die steady state Amplituden unter der vorangegangenen Periode schneller Reizung.
- 2) Die während der positiven Treppe erreichten Amplituden übertreffen kurzfristig diejenigen, welche in derselben Situation unter Kontrollbedingungen erzielt wurden.

Auch dieses inotrope Wirkmuster unterscheidet sich ganz erheblich von dem, das man durch Reduktion von $(Ca^{2+})_o$ erhält (siehe mittlerer Bildteil der Abb. 32).

Es ist allgemein anerkannt, dass am Warmblütermyokard die Amplitude einer Einzelkontraktion im wesentlichen durch die Menge an Calcium bestimmt wird, das im Moment der Erregung aus bestimmten Speichern des SR freigesetzt werden kann (siehe dazu auch 3.2.1). Es erhebt sich daher die Frage, von woher unmittelbar nach der Periode der elektromechanischen Entkoppelung dem SR freisetzbare Ca^{2+} zur Verfügung gestellt wird, sodass die kontraktile Aktivität so ausserordentlich schnell und überschüssig restituiert wird. Dies wirft das mehr allgemeine Problem der Füllungskinetik des SR auf. Durch Bestimmung der Amplituden-Pausenbeziehung einzelner Testkontraktionen (jeweils ausgelöst nach einer vorgegebenen Ruheperiode) erhält man ein recht gutes Korrelat zur Füllungskinetik dieser Speicher (HOMBURGER, SCHLEIERMACHER und ANTONI, 1973; siehe auch 3.1.5; 3.3.3).

Die Abb. 33 zeigt ein Registrierbeispiel. An isolierten Katzenpapillarmuskeln wurden Testkontraktionen jeweils 2, 4 und 8 sec nach Beendigung einer Periode frequenter Reizung (60/min) ausgelöst. Wie bereits von anderen Autoren gezeigt (HOMBURGER, SCHLEIERMACHER und ANTONI, 1973; MFIJLER, NIEUWENDIJK und DURRER, 1968; PUMBERGER und REICHEL, 1972; ANDERSON, MANRING und JOHNSON, 1973), steigen diese Füllungs- oder Restitutionskinetiken unter Kontrollbedingungen zunächst mit einer

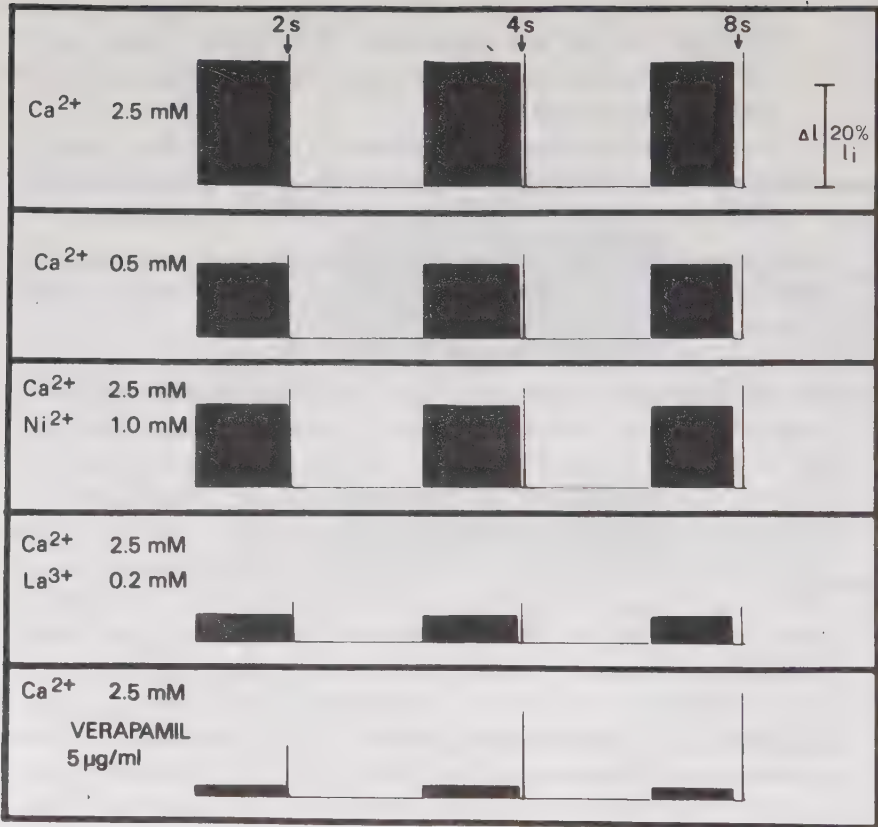


Abb. 33: Originalregistrierungen von Katzenpapillarmuskeln, die sich zuerst unter Gleichgewichtsbedingungen mit einer Frequenz von 60/min isotonisch kontrahierten. Nach Abbruch der rhythmischen Aktivierung wurden einzelne Testkontraktionen nach 2, 4 und 8 sec ausgelöst. Unter Einwirkung von Verapamil sind die Amplituden der Testkontraktionen nicht nur um ein Mehrfaches höher als die steady state Amplituden der vorausgehenden rhythmischen Reizung, sondern nehmen bei Verlängerung der Testintervalle noch deutlich zu. Senkung von $(\text{Ca}^{2+})_0$, Zugabe von Ni^{2+} oder La^{3+} bewirken eine annähernd proportionale Reduktion sowohl der steady state- als auch der Testkontraktionen.

Zeitkonstanten von etwa 300 msec steil an und erreichen nach 1 - 2 sec (zuweilen nach einem leichten Überspringen) ein Plateau. Dementsprechend variieren in dem hier gezeigten Kontrollexperiment die Amplituden der Testkontraktionen, ausgelöst nach 2, 4 und 8 sec kaum (oberer Bildteil der Abb. 13). Wird das Ruheintervall noch weiter verlängert, so nehmen die Amplituden der Testkontraktionen - allerdings sehr langsam - wieder ab. Bei partiellem Calciumentzug und nach Zugabe von Ni^{2+} (1.0 mM) oder La^{3+} (0.2 mM) findet man eine "Restitutionskurve" mit prinzipiell gleichem Verlauf.

Alle Kontraktionsamplituden sind lediglich proportional reduziert. Auch hier zeigt sich unter der Einwirkung von Verapamil ein völlig unterschiedliches Bild: Die Amplituden der Testkontraktionen (ausgelöst nach 2, 4 und 8 sec) sind

- 1) jede für sich um ein Mehrfaches höher als die Amplituden der steady state Kontraktionen während der vorausgegangenen frequenten Stimulation (60/min) und
 - 2) die Amplituden der Testkontraktionen nehmen bei Verlängerung des Testintervalls von 2 auf 8 sec deutlich zu.
- Dieser Befund weist stark darauf hin, dass Verapamil (und auch D 600) denjenigen Prozess verlangsamt, der die Wiederverfügbarkeit intrazellulären Aktivatorcalciums steuert.

Abb. 34 gibt Amplituden-Pausenbeziehungen wieder, gewonnen aus Experimenten, wie in den Originalregistrierungen der Abb. 13 gezeigt. Aus dem Kurvenverlauf geht hervor, dass Verapamil die Zeitkonstante des Restitutionsprozesses von ca. 300 msec (Kontrolle) auf 3 sec (2 $\mu\text{g/ml}$) verlängert; dagegen erscheinen die Restitutionskinetiken bei niedrigem $(\text{Ca}^{2+})_0$ oder unter Einwirkung von Ni^{2+} oder La^{3+} kaum verändert. (Ausnahme: Unter hohen Konzentrationen von Ni^{2+} tritt eine geringfügige Verlangsamung des Restitutionsvorganges ein). D 600 verursachte in jeder Hinsicht die gleichen Effekte, war aber etwa doppelt so wirksam wie Verapamil. Zugabe von Extracalcium konnte die Verapamil-bedingte Verzögerung des Restitutionsvorganges nicht beeinflussen; alle Testkontraktionen werden lediglich proportional angehoben.

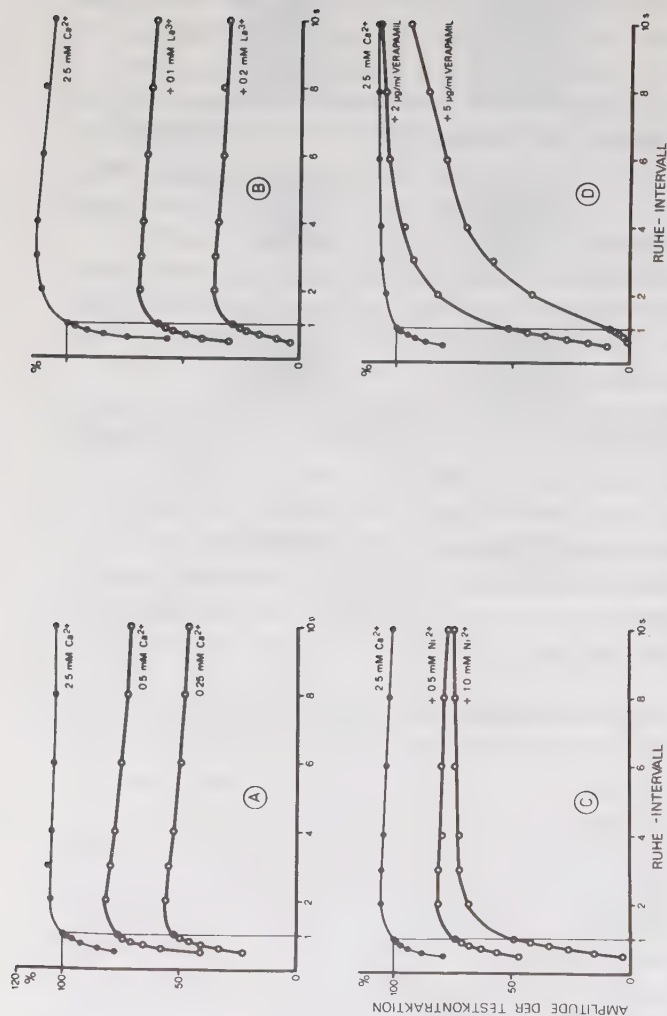


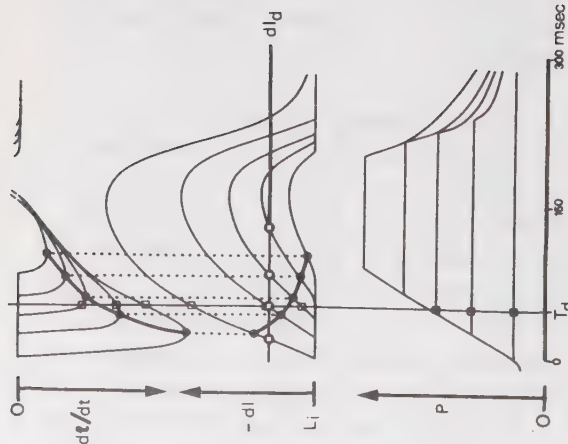
Abb. 34: Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen. Experimenteller Ablauf wie in den Originalregistrierungen der Abb. 13 dargestellt. Die Amplituden der Testkontraktionen wurden auf die steady state Amplitude unter Kontrollbedingungen bezogen (=100%). Senkung von Ca^{2+} (Bildteil A), Zugabe von La^{3+} (B) oder Ni^{2+} (C) führt zu einer generellen Reduktion der Testamplituden. Der zeitliche Verlauf des Restitutionsprozesses wird nur wenig beeinflusst. Im Gegensatz dazu flacht Verapamil (D) die Restitutionskurve deutlich ab. Dabei erreicht sie nach längeren Ruhe-Intervallen (10 sec) annähernd den Kontrollwert.

3.4.3 Die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen

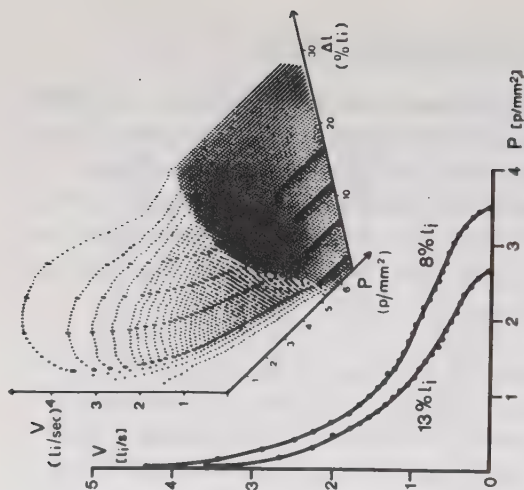
In einem weiteren Versuchsprogramm wurde untersucht, inwieweit Verapamil die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung isolierter Katzenpapillarmuskeln beeinflusst. Bei diesen Untersuchungen stand vor allem die Frage im Vordergrund, ob Verapamil - neben seiner negativ inotropen Wirkung - auch eine Verminderung der Kontraktilität im Sinne einer Reduktion der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit bewirkt.

Im Gegensatz zum Skelettmuskel ist jedoch die Bestimmung der Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung des Herzmuskels aus mehreren Gründen schwierig. Dies beruht in erster Linie darauf, dass der sogenannte "active state" des Myokards im Verlauf einer Einzelkontraktion kein Plateau erreicht wie im Falle des Skelettmuskels, sondern sich fortlaufend ändert. Darüberhinaus nimmt bei der isotonischen Kontraktion die Sarkomerlänge ständig ab, sodass auch die aktive Längen-Spannungsbeziehung in die Messung mit eingeht. Das bedeutet notwendigerweise, dass es beim Herzmuskel die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung nicht gibt; vielmehr müssen am Myokard Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen jeweils für einen definierten Zeitpunkt oder für eine bestimmte Muskellänge während des Kontraktionsverlaufs bestimmt werden. Dies erfordert jedoch einen erheblichen experimentellen Aufwand.

Bei der üblichen Kraft-Geschwindigkeitsanalyse werden gewöhnlich die jeweils erreichten Geschwindigkeitsmaxima mit der Belastung korreliert, gegen die sich der Muskel verkürzt. Bei dieser Form der Analyse werden gewöhnlich die jeweils erreichten Maxima der Verkürzungsgeschwindigkeit mit der Belastung korreliert, gegen die sich der Muskel verkürzt. Diese Geschwindigkeitsmaxima werden jedoch zu ganz verschiedenen Zeitpunkten der isotonen Kontraktion aber auch bei verschiedenen instantanen Längen erreicht (siehe Abb.35A). Eine so bestimmte Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung ist muskelmechanisch nicht eindeutig definiert, da jeder Messpunkt einer unterschiedlichen Intensität des "active state" zugeordnet ist.



A



B

Abb. 35: Schematische Darstellung der Messgrößen, die für eine Bestimmung der Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung benötigt werden. (A): Bei der herkömmlichen Messmethode werden die Geschwindigkeitsmaxima (volle Punkte) mit der jeweiligen Belastung P korreliert. Die Geschwindigkeitsmaxima werden jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten und Muskelängen erreicht. Bildteil (B) (nach HENNEKES et al., 1976) zeigt die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen für definierte Muskelängen (L_i , offene Punkte in Bildteil A), entnommen aus einem räumlichen Koordinatensystem, in dem die drei Parameter Kraft, Länge und Verkürzungsgeschwindigkeit simultan und kontinuierlich erfasst werden.

Alle Änderungen im zeitlichen Verlauf des active state würden sich daher auch in einer derart bestimmten Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung niederschlagen. Diese Schwierigkeit lässt sich nur vermeiden, wenn Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen zu einem definierten Zeitpunkt (T_d in Abb. 35A) oder jeweils bei einer definierten Längenänderung (dl_d in Abb. 35) bestimmt werden. Will man hierbei den gesamten Kontraktionsablauf muskelmechanisch erfassen, so ist dies nur im Rahmen eines dreiparametrigen Systems möglich, nämlich als Kraft-Geschwindigkeits-Zeit- bzw. als Kraft-Geschwindigkeits-Längenbeziehung. Ansätze einer derartigen Analyse wurden u.a. von BRUTSAERT und SONNENBLICK (1969) unternommen, indem die entsprechenden Daten aus konventionellen Aufzeichnungen der mechanischen Muskelaktivität entnommen und in ein räumlich-zeitliches Koordinatensystem übertragen wurden. Ein solches Verfahren ist jedoch mit einem hohen Auswerteaufwand und -fehler belastet.

Durch den Einsatz der digitalen Datenverarbeitung ist es heute jedoch möglich, eine "on line"-Analyse der Kraft-Geschwindigkeits-Längen- bzw. Kraft-Geschwindigkeits-Zeitbeziehungen mit vertretbarem technischen Aufwand durchzuführen (KAUFMANN und BAYER, 1973; BAYER und KAUFMANN, 1973; HENNEKES, KAUFMANN, STEINER, 1977). Die muskelmechanischen Messgrößen Kraft, Längenänderung und Verkürzungsgeschwindigkeit werden dazu wie üblich analog erfasst, sodann in einem A/D-Wandler fortlaufend digitalisiert, in einen Kernspeicher transferiert und schliesslich auf einem dreidimensionalen analogen Datendisplay dargestellt (ausführliche Beschreibung des Versuchsaufbaus siehe 2.3.3). Aus der Fülle der anfallenden Daten (Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen, bestimmt für 64 definierte Muskellängen bzw. zu 64 definierten Zeitpunkten) können Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen - einzeln oder in Gruppen - herausgegriffen und auf einem XY-Plotter aufgezeichnet werden (siehe Abb. 35B).

Wie die Originalregistrierung der Abb. 35B zeigt, erreicht der Herzmuskel selbst bei echter Nullbelastung (siehe unten) seine maximale Verkürzungsgeschwindigkeit erst bei einer

bestimmten Länge, bzw. erst nach einer bestimmten Zeit. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass sich der "active state" beim Myokard relativ langsam entwickelt. Es wird also die Summe der aktivierten Querbrücken erst eine gewisse Zeit nach Kontraktionsbeginn so gross sein, dass der unvermeidbare innere Reibungswiderstand der Muskelzelle sowie die Masse des zu beschleunigenden Aufnehmersystems keine Rolle mehr spielen. Es können daher Messungen von $V_{\max}$ nur zu solchen Zeitpunkten vorgenommen werden, da der "active state" sein Maximum durchläuft. Dies ist in der Kraft-Geschwindigkeits-Längenanalyse etwa bei einer Verkürzung von 7 - 12% L_1 der Fall.

Eine weitere gravierende Schwierigkeit bei der experimentellen Bestimmung von $V_{\max}$ besteht darin, dass der Herzmuskel selbst im flachen Teil der Ruhedehnungskurve relativ hohe Vorbelastungen zur Überwindung der Parallelelastizität benötigt. Wie in der Abb. 36A schematisch dargestellt, kontrahiert sich das kontraktile Element bei einer rein isotonischen Kontraktion (ausgehend z.B. von der Länge L_1 , entsprechend einer Vorbelastung von P_1) nicht gegen die Belastung Null, sondern gegen eine mit zunehmender Verkürzung wachsende Belastung. Diese Belastung ist gegeben durch die jeweilige Differenz zwischen P_1 und den entsprechenden P-Werten der Ruhedehnungskurve (punktierter Bereich in Abb. 36A). Eine Kontraktion des kontraktilen Elements gegen echte Nullbelastung wird nur dann möglich, wenn während der Verkürzung die Belastung kontinuierlich auf den jeweiligen P-Wert der Ruhedehnungskurve reduziert wird. Um das zu erreichen, kann man sich der Technik des sogenannten "kontrollierten Release" bedienen (BRADY, 1965; BRUTSAERT, CLAES und SONNENBLICK, 1971; HENNEKES, KAUFMANN und STEINER, 1976). Bei richtiger Durchführung kontrahiert sich dabei der Muskel praktisch entlang seiner Ruhedehnungskurve bzw. bei nachbelasteten Kontraktionen auf einer dazu parallel nach oben verschobenen Belastungskurve.

Die Originalregistrierungen der Abb. 36B enthalten Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen für den Längenbereich von 7.5 bis 18% L_1 . Im Bildteil B wurde ohne kontrollierten Release bei

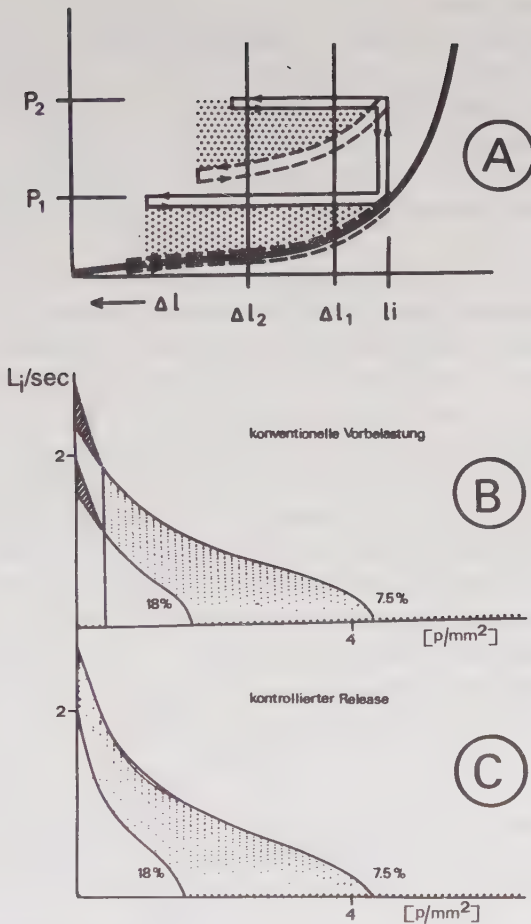


Abb. 36: Technik des "kontrollierten Releases". Die schematische Zeichnung (A) macht deutlich, dass sich das kontraktile Element bei einer Vordehnung l_i (entsprechend einer Vorbelastung P_1) während seiner isotonischen Verkürzung gegen eine wachsende Belastung (punktierter Bezirk) verkürzt. Beim "kontrollierten Release" wird während der isotonischen Kontraktion die Vorbelastung kontinuierlich auf den entsprechenden P-Wert der Ruhedehnungskurve reduziert, sodass sich der Muskel entlang der Ruhedehnungskurve verkürzt. Bildteil (B): Originalregistrierungen von Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen ohne "kontrollierten Release" für Muskellängen von 7.5-18% l_i . Die Bestimmung von $V_{\max}$ durch Extrapolation ist mit grossem Messfehler (schraffierte Zone) behaftet. Bildteil (C): Direkte Messung von $V_{\max}$ unter Anwendung des "kontrollierten Release".

einer Vorbelastung von 0.4 p/mm^2 gearbeitet. Dementsprechend endet die Kraft-Geschwindigkeitskurve bei diesem P-Wert. Zur Bestimmung von $V_{\max}$ müssten die Kurven in üblicher Weise zum Schnittpunkt mit der Ordinate extrapoliert werden, was selbst bei geringen Vorbelastungen mit erheblicher Unsicherheit belastet ist. Diese Schwierigkeit entfällt bei Anwendung des "kontrollierten Release" wie in Abb. 36C dargestellt.

In der Abb. 37 sind Längen-definierte Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen isolierter Katzenpapillarmuskeln, erhalten unter verschiedenen Versuchsbedingungen, gegenübergestellt: Eine Änderung der Vorbelastung (Bildteil A) führt - entsprechend der aktiven Längen-Spannungsbeziehung - zu unterschiedlichen maximalen isometrischen Gipfelspannungen. Die Kraft-Geschwindigkeitsanalyse zeigt jedoch klar, dass sich bei Variation von L_i die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit vergleichsweise nur sehr gering ändert. Nahezu das gleiche Bild ergibt sich bei Reduktion von $(\text{Ca}^{2+})_0$ (Bildteil B) oder nach Zugabe von Verapamil. Auch hier zeigen die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen (in diesen Fällen bestimmt für Muskellängen von jeweils 7.5 und 13% L_i) eine deutliche Abnahme von P_0 ; im Vergleich dazu nimmt $V_{\max}$ nur geringfügig ab.

Es ist heute allgemein anerkannt, dass P_0 im wesentlichen von der Anzahl der aktivierbaren Querbrücken, $V_{\max}$ dagegen nur von der maximalen Geschwindigkeit der individuellen Querbrückenbewegung abhängt (zusammenfassende Darstellung siehe KATZ, 1973). Die Beeinflussung der Kraft-Geschwindigkeitsbeziehung durch Änderung der Vorbelastung lässt sich daher zwanglos dadurch erklären, dass mit zunehmender Vordehnung die Überlappungszone der kontraktilen Filamente und damit die Zahl der aktivierten Querbrücken abnimmt, dass sich jedoch die Geschwindigkeits-bestimmenden Reaktionskonstanten bei der einzelnen Querbrückeninteraktion nicht ändern. Bei konstanter Vorbelastung bewirkt eine Senkung von $(\text{Ca}^{2+})_0$ offensichtlich ebenfalls nur eine zahlenmässige

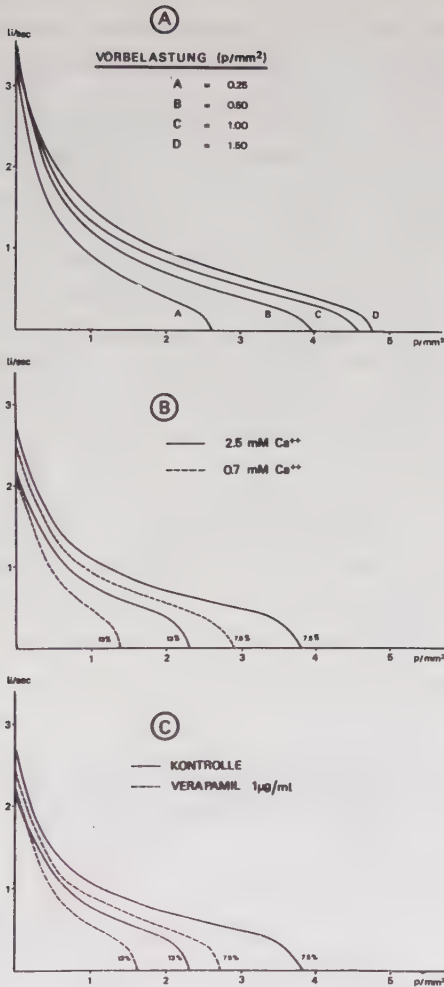


Abb. 37: Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen für definierte Muskellängen (% L_1). Direkte Messung der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit durch Anwendung des "kontrollierten Release". Bildteil (A): Variation der Vorbelastung führt entsprechend der aktiven Längen-Spannungsbeziehung zu unterschiedlichen maximalen isometrischen Gipfelspannungen (P_0 = Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse). Die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit (V_{max} = Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate) wird nur wenig verändert. Bildteil (B) und (C): Senkung von $(Ca^{2+})_0$ oder Zugabe von Verapamil reduziert V_{max} nur wenig; P_0 wird dagegen deutlich vermindert.

Reduktion der Querbrücken, bedingt durch ein vermindertes Ca^{2+} -Angebot zur Bindung an die Troponinmoleküle.

Die bei allen hier dargestellten Versuchen beobachteten geringfügigen Änderungen von $V_{\max}$ müssen nicht unbedingt leichte Änderungen in der Geschwindigkeit des Querbrückenschlages widerspiegeln. Es könnte sein, dass sich die kontraktile Elemente auch bei Nullbelastung gegen einen inneren Widerstand (internal load) kontrahieren (BRUTSAERT, CLAES und GOETHALS, 1973). Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass auch Verapamil $V_{\max}$, und damit die Geschwindigkeit des Querbrückenschlages, nur sehr wenig beeinflusst. Andererseits weist die deutliche Abnahme von P_0 darauf hin, dass der negativ inotrope Verapamileffekt auf ein vermindertes Ca^{2+} -Angebot an die regulativen Proteine und daraus folgend auf eine zahlenmäßige Reduktion aktivierter Querbrücken während des Kontraktionszyklus zurückzuführen ist. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Wirkungen von Verapamil und Calciumentzug - zumindest rein formal - nicht.

3.5 DER EINFLUSS VON VERAPAMIL AUF DAS ELEKTRISCHE VERHALTEN ISOLIERTER KATZENPAPILLARMUSKELN

3.5.1 Der langsame Einwärtsstrom

Auf den ersten Blick hin ist man versucht, die negativ inotrope Wirkung von Verapamil, insbesondere die Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung, einer frequenzabhängigen Hemmung der transmembranären Calciumversorgung zuzuschreiben. Es lag daher nahe, mit Hilfe von voltage clamp-Untersuchungen zu prüfen, ob sich eine derartige Frequenzabhängigkeit der Wirkung auch bei der Inhibition des langsamen Calcium-einwärtsstromes (I_{Ca}) wiederfindet. Zu diesem Zweck wurden die Präparate periodisch geklemmt und zwar mit einer Frequenz von 6/min bzw. 60/min.

Um den schnellen Einwärtsstrom (I_{Na}) vom langsamen I_{Ca} messtechnisch trennen zu können, wurde das von REUTER und BEELER (1969) eingeführte Verfahren der konditionierenden Klemmtechnik benutzt: Ausgehend von einem Haltepotential (HP) von -80 mV wird durch einen ersten Klemmschritt die Membran auf etwa -50 bis -40 mV depolarisiert (siehe Abb. 38). Durch diesen konditionierenden ersten Klemmschritt wird der schnelle I_{Na} ausgelöst und inaktiviert. Sodann wird in einem zweiten Klemmschritt das Membranpotential weiter stufenweise depolarisiert. Der transitorische Einwärtsstrom, der durch diesen zweiten Klemmschritt ausgelöst wird, hat hinsichtlich Aktivierung und Inaktivierung bedeutend grössere Zeitkonstanten als der zuvor ausgelöste schnelle I_{Na} . Er wird daher als langsamer (Calcium-) Einwärtsstrom bezeichnet. In den vorliegenden Experimenten betrug die Dauer des zweiten Klemmschritts 250 - 650 msec.

Wie aus Abb. 38 erkennbar, ist unter Kontrollbedingungen die Amplitude und der zeitliche Verlauf des I_{Ca} weitgehend frequenzunabhängig. Nach plötzlichem Übergang der Zyklusfrequenz von 6 auf 60/min (unteres Bild in der Kontrollreihe) wird bestenfalls eine Amplitudenabnahme des transitorischen I_{Ca} um weniger als 10% sichtbar. Unter Einwirkung von Verapamil (1.0 $\mu\text{g/ml}$) ist die Amplitude des I_{Ca} bei einer Zyklusfrequenz von 6/min nur wenig gegenüber dem Kontrollwert reduziert, während bei einer Aktivierungsfrequenz von 60/min eine drastische Abnahme eintritt. Beim plötzlichen Wechsel der Zyklusfrequenz von 6 auf 60/min werden etwa 10 Zyklen benötigt, bis die Amplitude des transitorischen Einwärtsstroms ein neues Gleichgewicht erreicht. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des I_{Ca} , dann fällt auf, dass Verapamil offensichtlich die Zeitkonstanten von Aktivierung (τ_a) und Inaktivierung (τ_i) nicht verändert.

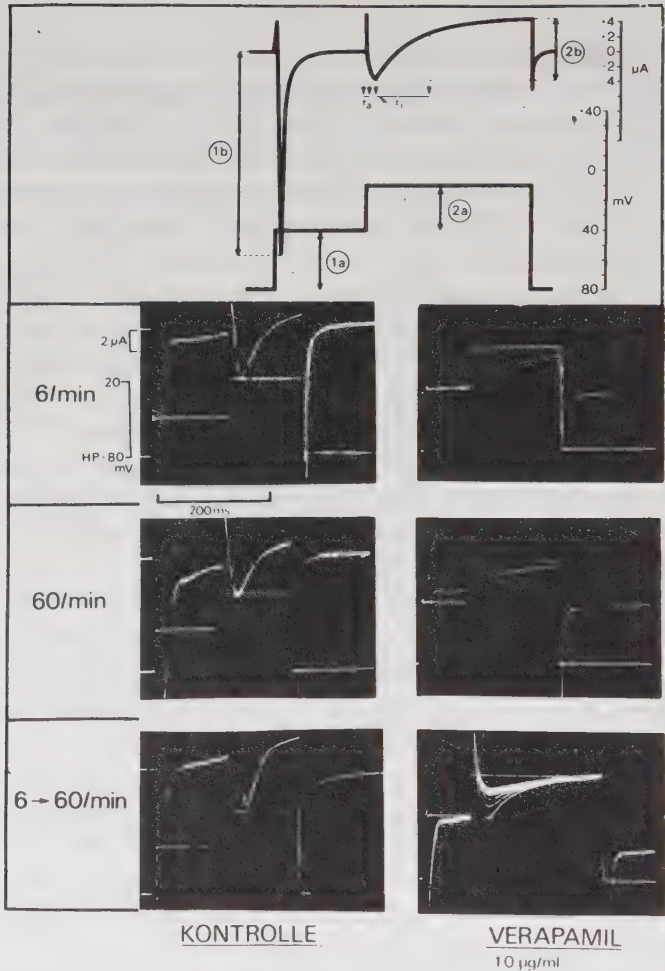


Abb. 38: Abhängigkeit des langsamen Einwärtsstromes von der Frequenz der Klemmpulse. Experimenteller Ablauf siehe oberer Bildteil: Nach Inaktivierung des schnellen I_{Na} durch einen ersten Klemmschritt (1a) wurde mittels eines zweiten Klemmpulses (2a) der langsame Einwärtsstrom (2b) ausgelöst. Unter Kontrollbedingungen bleiben Amplitude und zeitlicher Verlauf des langsamen Einwärtsstromes im Frequenzbereich von 6-60/min nahezu unverändert. Verapamil bewirkt eine geringe Abnahme des langsamen Einwärtsstromes bei 6/min; nach Frequenzerhöhung auf 60/min wird diese Depression viel intensiver.

Dies könnte bedeuten, dass die Inhibition des langsamen Einwärtsstroms Folge einer generellen Verminderung aktivierbarer langsamer Membrankanäle ist ¹⁾.

Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Verapamil den Erholungsprozess verlangsamt, der für die Wiederverfügbarkeit (recovery) des langsamen Membrankanals nach abgelaufener Aktivierung und Inaktivierung verantwortlich ist. Einen derartigen Wirkmechanismus haben KOHLHARDT, KÜBLER und HERDEY (1974) für das Verapamilanalog D 600 postuliert.

Zur Messung der sogenannten "recovery from inactivation" bedarf es des in Abb. 39 schematisch wiedergegebenen experimentellen Verfahrens: Der Klemmzyklus besteht hier wieder aus einem ersten konditionierenden Schritt zur Inaktivierung des schnellen I_{Na} und einem zweiten Klemmschritt, mit dem der langsame Einwärtsstrom ausgelöst wird. Am Ende dieses Klemmimpulses wird das Membranpotential jedoch nicht auf das ursprüngliche Haltepotential von -80 mV zurückgeklammert, sondern lediglich auf das konditionierende Potential des ersten Klemmschritts (-45 mV). Mit variablem Abstand folgt dann ein erneuter depolarisierender Schritt zur Auslösung des I_{Ca} . Wenn man das Intervall zwischen diesen gleichartigen Klemmimpulsen verringert, dann nimmt die Amplitude des durch den zweiten Klemmimpuls ausgelösten langsamen Einwärtsstroms exponentiell ab. Diese Amplitude ist Mass für die Wiederverfügbarkeit des langsamen Membrankanals nach vorausgegangener Aktivierung und Inaktivierung. Untersuchungen dieser Art am isolierten Myokard der Katze wurden u.a. von KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLER und HERDEY (1975) vorgenommen. Dabei fanden die Autoren für diesen Erholungsprozess eine Zeitkonstante (τ_r)

¹⁾ Dies würde dem Wirkprinzip von Tetrodotoxin am schnellen Na-Membrankanal entsprechen. Bekanntlich blockiert TTX aktivierte Membrankanäle und reduziert damit die Zahl der Kanäle, durch die Na^+ in die Zelle gelangen kann (CUERVO und ADELMAN, 1970).

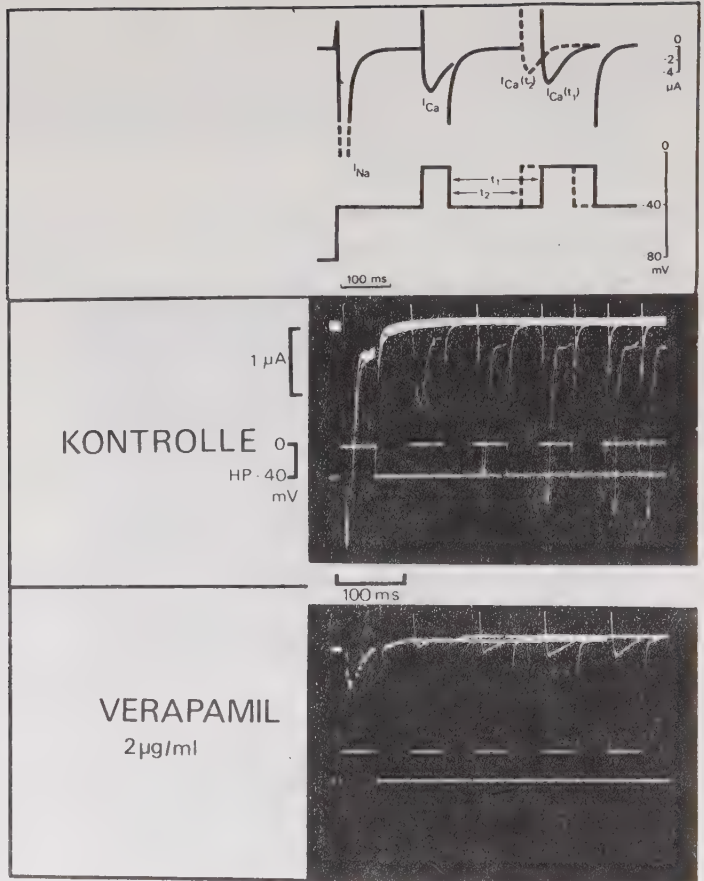


Abb. 39: Bestimmung der "recovery" des langsamen Einwärtsstromes. Messverfahren siehe schematische Zeichnung im oberen Bildteil: Nach Inaktivierung von I_{Na} durch Senkung des Haltepotentials auf -40 mV wird der I_{Ca} von einem weiteren Klemmimpuls ausgelöst. Nach Repolarisation auf -40 mV wird sodann nach unterschiedlichen Intervallen (t_1, t_2 etc.) durch einen Klemmimpuls erneut der langsame Einwärtsstrom ($I_{Ca}(t_1), I_{Ca}(t_2)$ etc.) aktiviert. Trägt man die Maxima des transitorischen langsamen Einwärtsstromes gegen die Aktivierungsintervalle "t" auf, so kann man aus der erhaltenen Kurve die Zeitkonstante der recovery τ_r ermitteln. Der untere Bildteil zeigt ein Registrierbeispiel zur Ermittlung von τ_r unter dem Einfluss von Verapamil. In diesem Experiment verlängert sich τ_r von 250 msec (Kontrollwert) auf 600 msec unter Verapamil.

von etwa 300 msec. In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurde von uns für den "recovery-Prozess" eine durchschnittliche Zeitkonstante von 280 msec ermittelt.

Die Abb. 39 zeigt Originalregistrierungen eines typischen Experiments zur Bestimmung der "recovery". Unter Kontrollbedingungen verläuft der Erholungsprozess mit einer Zeitkonstanten von ca. 250 msec. Nach Zugabe von Verapamil (2 µg/ml) sind die Amplituden der phasischen langsamen Einwärtsströme insgesamt reduziert. Besonders auffällig ist, dass die "recovery" (d.h. die Zunahme des langsamen Einwärtsstromes bei Verlängerung der Aktivierungsintervalle "t") stark verlangsamt abläuft. Die Zeitkonstante wurde in diesem Experiment nach Zugabe von Verapamil auf über 600 msec verlängert.

3.5.2 Das monophasische Aktionspotential

Die typische frequenzabhängige Reduktion des I_{Ca} unter Verapamil sollte sich auch auf den Verlauf des monophasischen Aktionspotentials auswirken. Wie allgemein anerkannt, wird insbesondere die Dauer des Aktionspotentialplateaus durch den I_{Ca} bestimmt (REUTER, 1973a; GETTES und REUTER, 1974; SIMURDA, SIMURDA, BRAVENY und SUMBERA, 1976).

Die Originalregistrierung der Abb. 40 zeigt den Einfluss von Verapamil (4 µg/ml) auf den zeitlichen Verlauf des Aktionspotentials und die maximale Aufstrichsgeschwindigkeit. Jeder Bildteil zeigt 10 - 15 übereinanderprojizierte Aktionspotentiale, die jeweils nach plötzlichem Frequenzwechsel von 15 auf 90/min oder von 90 auf 15/min registriert wurden. Bei langsamer Reizfrequenz verändert Verapamil den Verlauf der frühen Phase des Aktionspotentialplateaus (gemessen bei etwa 20% Repolarisation) nur unwesentlich, führt aber zu einer

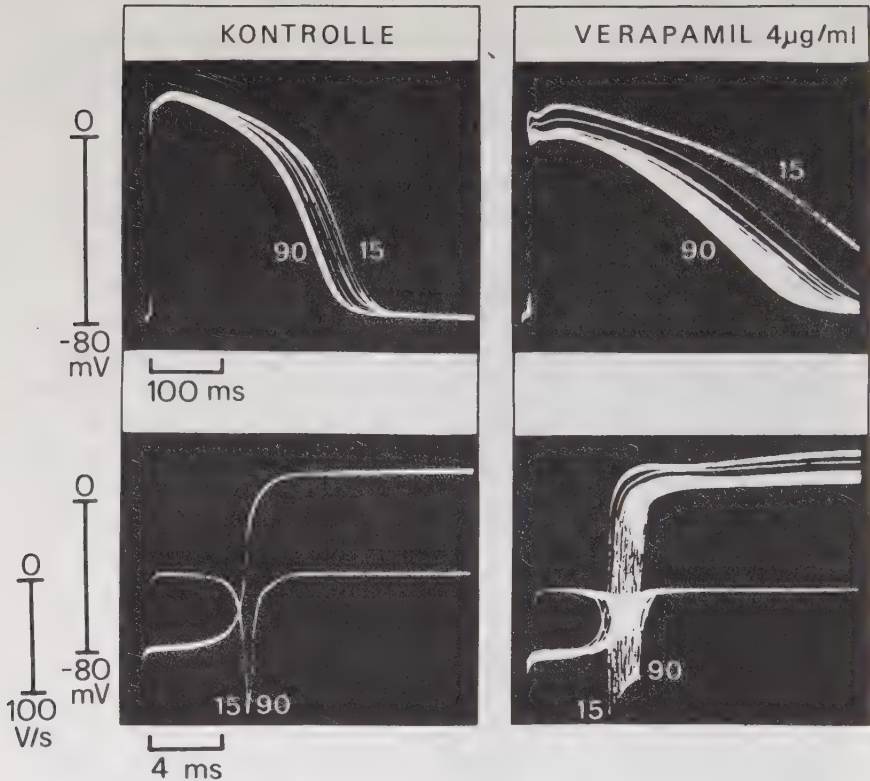


Abb. 40: Obere Bildreihe: Zeitlicher Verlauf des transmembranären Aktionspotentials eines isolierten Katzenpapillarmuskels unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von Verapamil. Untere Bildreihe: Schneller Aufstrich des Aktionspotentials und seine erste Ableitung dv/dt (Aufstrichsgeschwindigkeit), registriert bei hoher Ablenkgeschwindigkeit des Kathodenstrahls. Jeder Bildteil enthält 10-12 übereinander geschriebene Aktionspotentiale, aufgezeichnet nach plötzlicher Steigerung der Reizfrequenz von 15 auf 90/min. Verapamil verlängert bei allen Reizfrequenzen das monophasische Aktionspotential im Bereich der finalen Repolarisation. Zusätzlich wird bei hoher Reizfrequenz das Aktionspotentialplateau deutlich abgeflacht und die maximale Aufstrichsgeschwindigkeit reduziert.

deutlichen Verlängerung in der späten Repolarisation. Bei Erhöhung der Reizfrequenz kommt es - wie erwartet - zu einer starken Verkürzung des frühen Aktionspotentialplateaus (genauer: Zu einer Verschiebung der Plateauhöhe in einen weniger positiven Potentialbereich). Auch bei der hohen Reizfrequenz von 90/min bleibt unter Einwirkung von Verapamil die finale Repolarisation deutlich verzögert¹⁾.

Der Zusammenhang zwischen frequenzabhängiger Reduktion des langsamen Einwärtsstroms und frequenzabhängiger Verkürzung des Aktionspotentialplateaus wird durch ein voltage clamp-Experiment besonders augenscheinlich, bei dem sowohl der langsame Einwärtsstrom als auch das monophasische Aktionspotential registriert wurde (siehe Abb. 41). Entsprechend dem in Abb. 38 dargestellten Versuch wurde auch hier die Zyklusfrequenz (von 6 auf 60/min) erhöht und die Veränderungen der Einwärtsströme durch Superposition von 10 aufeinander folgenden Klemmzyklen registriert. Zusätzlich wurden noch zwei Aktionspotentialverläufe aufgezeichnet: Der erste (Spur 1) bei einer Reizfrequenz von 6/min unmittelbar vor dem Frequenzsprung, der zweite (Spur 2) unmittelbar nach Beendigung der 10 Zyklen dauernden Aktivierung mit einer Frequenz von 60/min. Unter Kontrollbedingungen findet sich hier die bekannte geringgradige Abnahme der Aktionspotentialdauer bei Wechsel von einer niedrigen auf eine hohe Frequenz. Ein völlig anderes Bild bietet sich nach Zugabe von Verapamil (0.5 µg/ml). Hier

¹⁾ Zur Erklärung der verzögerten Repolarisation muss nicht zwangsläufig eine zusätzliche Hemmung des potentialabhängigen K⁺-Auswärtsstroms postuliert werden. Es gibt viel Anhaltspunkte dafür, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration den K⁺-Auswärtsstrom in gewissen Grenzen mitbestimmt. Sowohl am Aplysianeuron als auch an verschiedenen isolierten Myokardgeweben konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung von (Ca²⁺)_i den K⁺-Auswärtsstrom hemmt und damit am Myokard eine Verlängerung des Aktionspotentials bewirkt (MEECH, 1972; BROWN und BROWN, 1973; KASS und TSIEN, 1976; ISENBERG, 1975; McNAUGHTON, 1976; McGUIGAN und BASSINGTHWAIGHTE, 1974; McGUIGAN, 1974; BASSINGTHWAIGHTE, FRY und McGUIGAN, 1976).

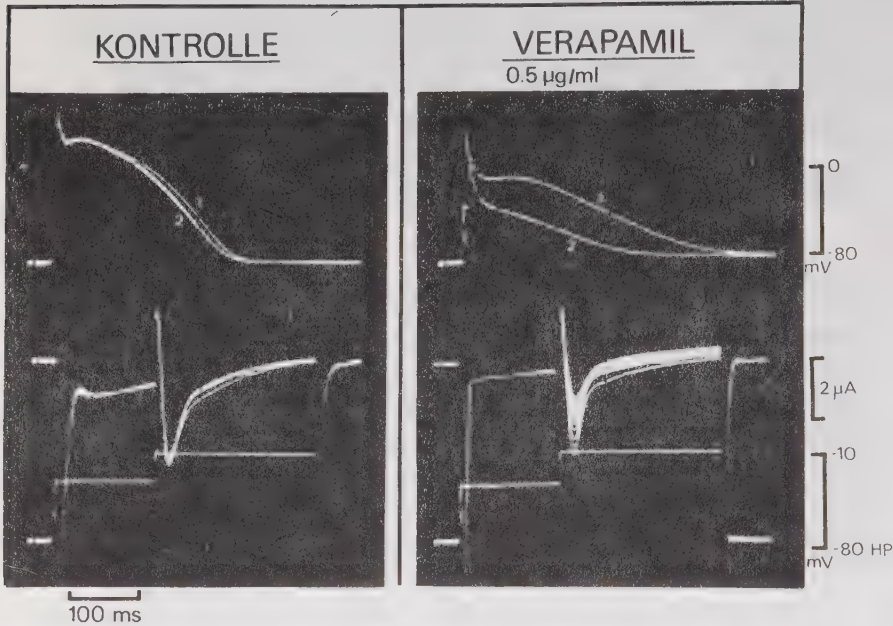


Abb. 41: Kombinierte Messung des transmembranären Aktionspotentials und des langsamen Einwärtsstromes. Experimentelles Vorgehen zur Strommessung siehe Abb. 36. Es wurde von einer langsamen Zyklusfrequenz (6/min) auf eine hohe Frequenz (60/min) umgeschaltet und die einzelnen konsekutiven Zyklen auf dem Oszillographenschirm gemeinsam dargestellt. Weiterhin wurde unmittelbar vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Frequenzwechsel ein Aktionspotential registriert. Unter Verapamil nimmt nach Frequenzsteigerung der langsame Einwärtsstrom von Aktivierung zu Aktivierung treppenförmig ab. Als Ausdruck des reduzierten langsamen Einwärtsstromes ist das Plateau des in dieser Situation registrierten Aktionspotentials deutlich gesenkt.

ist bei langsamer Reiz- bzw. Zyklusfrequenz die finale Repolarisation des Aktionspotentials gegenüber der Kontrolle erheblich verlängert; bei Frequenzwechsel auf 60/min nimmt der langsame Einwärtsstrom in der schon oben beschriebenen Weise während 10 Schlägen auf etwa ein Drittel des Wertes ab, der bei einer Zyklusfrequenz von 6/min gemessen wurde. Das unmittelbar danach registrierte Aktionspotential ist durch einen extremen Plateauverlust gekennzeichnet, der bei Rückkehr zur Ausgangsfrequenz von 6/min im Verlauf von etwa 20 bis 30 Zyklen voll reversibel ist.

Neben der charakteristischen Wirkung auf den Verlauf des Aktionspotentialplateaus reduziert Verapamil auch die maximale Aufstrichsgeschwindigkeit (unterer Bildteil der Abb. 40). Dieser Effekt wird bei hoher Reizfrequenz besonders deutlich. Es muss daher zusätzlich eine Verapamil-bedingte Hemmung der "recovery" des schnellen Na^+ -Einwärtsstroms angenommen werden. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass dieser Zusatzeffekt nicht auf eine "unspezifische" Membranwirkung zurückzuführen ist, sondern darauf, dass razemisches Verapamil aus einem calciumantagonistischen (-)-Isomer und einem natriumantagonistischen (+)-Isomer besteht (BAYER, HENNEKES, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975; BAYER, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975; BAYER, KALUSCHE, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975).

3.6 VERSUCH EINER ZUORDNUNG DER EFFEKTE CALCIUMANTAGONISTISCHER MASSNAHMEN ZU SPEZIFISCHEN WIRKORTEN. EINSATZ DES ANALOGMODELLS ZUR WIRKORTANALYSE

Die in Kapitel 3.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sogenannte Calciumantagonisten recht unterschiedliche Muster inotroper Wirkungen entfalten. Speziell Verapamil und sein Methoxyanalog D 600 verändern das inotrope Verhaltensmuster des isolierten Warmblütermyokards in sehr charakteristischer Weise. Im Gegensatz zu den "klassischen" calciumantagonistischen Messmassnahmen (partieller Calciumentzug, Zugabe von Ni^{2+} oder La^{3+}) hemmt Verapamil die kontraktile Aktivität fast ausschliesslich bei hoher Reizfrequenz und induziert bei plötzlichem Frequenzwechsel charakteristische Trepphenomene (siehe 3.4.1). Zusätzlich wird die Kinetik des Prozesses verlangsamt, der während einer Kontraktionspause für die Restitution der kontraktilen Aktivität sorgt (siehe 3.4.2). Letzteres lässt vermuten, dass Verapamil neben seiner hemmenden Wirkung am langsamen Membrankanal (Kapitel 3.5; siehe auch KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972; KOHLHARDT, KÜBLER und HERDEY, 1974; BAKER, MEVES und RIDGWAY, 1973) durch einen zusätzlichen Wirkmechanismus den Ablauf der elektromechanischen Koppelung des Myokards behindert.

Reduziert man im Analogmodell der elektromechanischen Koppelung allein die Grösse des transmembranären Ca^{2+} -Einwärtsstroms (Konstanten k_1 und k_7 ; siehe Reaktionsschema der Abb. 15), so erhält man ein inotropes Verhaltensmuster, das dem eines Verapamil-behandelten Papillarmuskels in keiner Hinsicht entspricht. Reduktion von k_1 und k_7 führt lediglich zu einer generellen Abnahme der Kontraktionsamplituden bei allen Reizfrequenzen. Das Computer-simulierte inotrope Verhaltensmuster (Abb. 42B) entspricht weitestgehend demjenigen, welches man am lebenden Myokardpräparat unter Reduktion von $(\text{Ca}^{2+})_0$, bzw. nach Zugabe von Ni^{2+} oder La^{3+} beobachtet.

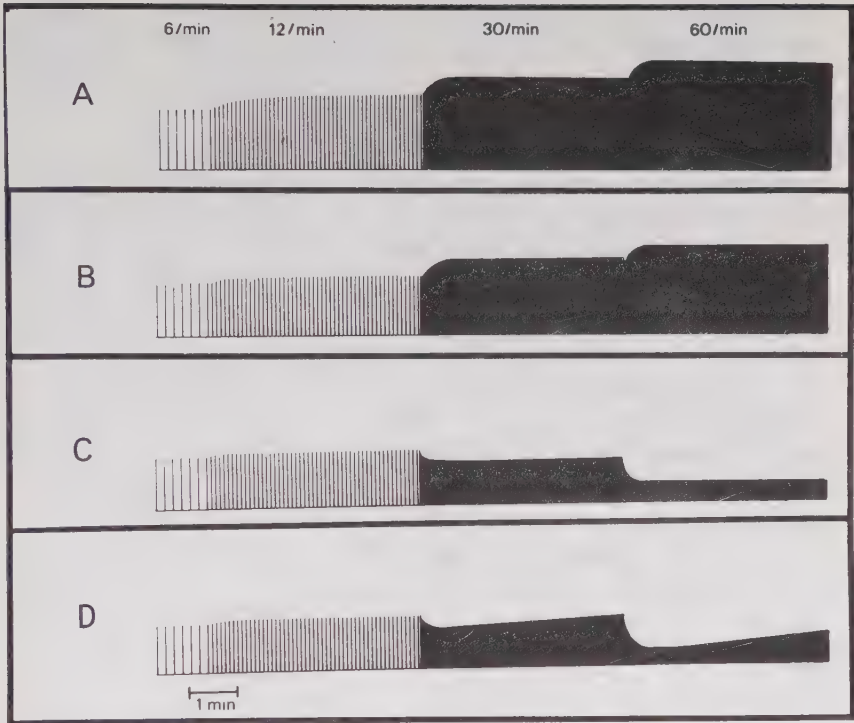


Abb. 42: Amplituden-Frequenzbeziehung des Modells der elektromechanischen Koppelung unter (A) Kontrollbedingungen (Werte siehe Tabelle 1 in Kapitel 3.2.4) und (B - D) nach Veränderungen von Reaktionskonstanten. Reduktion des transmembranären Calciumeinwärtsstromes ($1k_1$; $1k_7$; siehe Abb. 16) bewirkt eine gleichmäßige Abnahme der Kontraktionsamplituden bei allen Reizfrequenzen (B). Wird zusätzlich die "recovery from inactivation" des langsamen Einwärtsstromes (τ_r) verlangsamt, so kommt es im höheren Frequenzbereich zu einer Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung (C). Zur Nachbildung des Amplituden-Frequenzverhaltens des Verapamil-behandelten Papillarmuskels (siehe Abb. 29) muss darüberhinaus die Reaktionskonstante $1k_3$ reduziert werden. Diese Konstante bestimmt im Ausdruck $\beta 1k_3$ die Geschwindigkeit der potentialabhängigen Calcium-Translokation von den primären Rückbindungsstellen zu den Freisetzungsorten des SR.

Aus unseren voltage clamp-Messungen geht deutlich hervor, dass die Hemmung des langsamen Membrankanals durch Verapamil sich prinzipiell von der Reduktion des langsamen Ca^{2+} -Einwärtsstroms bei partiellem Ca^{2+} -Entzug unterscheidet (siehe dazu auch KOHLHARDT, KÜBLER und HERDEY, 1974). Durch Variation von $(\text{Ca}^{2+})_o$ werden bekanntlich die Eigenschaften des langsamen Membrankanals ("activation, inactivation, recovery from inactivation") nur sehr wenig verändert (KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLER und HERDEY, 1975); es wird an erster Stelle die Ca^{2+} -Menge determiniert, die dem Kanal zum Transport angeboten wird. Ni^{2+} und La^{3+} scheinen ebenfalls die Eigenschaften des langsamen Kanals nicht zu beeinflussen. Es wird vermutet, dass hier die Hemmung des langsamen Einwärtsstromes auf einer (kompetitiven?) Verdrängung von Ca^{2+} aus Bindungsstellen in der Plasmamembran bzw. im Membrankanal selbst beruht (REUTER, 1973a; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1973; LANGER, SERENA und NUDD, 1974). Im Gegensatz dazu greifen die organischen Calciumantagonisten Verapamil und D 600 direkt in die Funktion des langsamen Membrankanals ein, indem sie die "recovery from inactivation" verlangsamen¹⁾. Es wurde deshalb im Analogmodell - neben der generellen Reduktion des langsamen Einwärtsstroms - die "recovery from inactivation" durch entsprechende Reduktion der Zeitkonstanten τ_r verlangsamt. Wie die Abb. 42C zeigt, entspricht auch nach dieser zusätzlichen Programmänderung das Amplituden-Frequenzverhalten des Computers

1) Unter dem Begriff "Calciumantagonisten" (FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967) ist also lediglich eine grosse Gruppe von Substanzen zusammengefasst, deren Klassifizierung auf einer ihnen allen gemeinsamen Hemmwirkung auf Calciumbewegungen im Rahmen der elektromechanischen Koppelung des Herzens und des glatten Muskels beruht. Die unterschiedliche Beeinflussung des langsamen Einwärtsstroms und die Unterschiede der inotropen Wirkmuster von Verapamil und Kationen (Ni^{2+} , La^{3+}) einerseits, und anderen organischen Calciumantagonisten (Prenylamine, Nifedipine) andererseits, lassen vermuten, dass diese Substanzen über unterschiedliche Wirkorte und -mechanismen in zelluläre und subzelluläre Calciumbewegungen eingreifen (BAYEP, PODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976)

nicht vollkommen dem eines Verapamil-behandelten Papillarmuskels. Es zeigt sich lediglich eine Verminderung der Kontraktionsamplituden bei allen Reizfrequenzen und eine Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung.

Dies bedeutet, dass die mehrfach nachgewiesene Wirkung von Verapamil auf den langsamen transmembranären Calciumeinwärtsstrom (KÖHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972; BAKER, MEVES und RIDGWAY, 1973; eigene Befunde siehe 3.5.1) allein nicht zur Erklärung folgender kontraktiler Phänomene ausreicht:

- 1) der langsamen Treppenphänomene, die bei plötzlicher Änderung der Reizfrequenz auftreten (siehe Abb. 27),
- 2) der Verlangsamung der Restitutionskinetiken, wie man sie aus der Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen erhält (Abb. 33 und 34) und
- 3) der extrem hohen und überschüssenden Amplituden, die bei plötzlicher Frequenzreduktion auftreten (Abb. 32).

Besonders der letzte Punkt gibt Anlass zu überdenken, ob Verapamil tatsächlich nur die transmembranäre Calciumversorgung inhibiert. Die Annahme dieses rein membranären Angriffspunkts würde zwingend bedeuten, dass durch Verapamil die intrazellulären Speichersysteme des SR - insbesondere bei hohen Reizfrequenzen - entleert werden. Im Gegensatz dazu konnten wir nachweisen, dass innerhalb weniger Sekunden normal viel oder sogar übermässig viel Calcium zur Aktivierung mobilisiert werden kann. Eine Entleerung der intrazellulären Speicher erscheint deshalb unwahrscheinlich. Ausserdem haben Tracerfluxmessungen an Meerschweinchenvorhöfen belegt, dass Verapamil die insgesamt austauschbare Calciummenge nicht oder nur unwesentlich reduziert (SILVA GRACA und VAN ZWIETEN, 1971). Durch diese Befunde werden wir mit der komplizierten Aufgabe konfrontiert, folgende Ergebnisse auf einen Nenner zu bringen:

- 1) Verapamil hemmt den langsamen Einwärtsstrom.
- 2) Die austauschbare Calciumgesamtmenge ist nicht wesentlich vermindert.
- 3) Calcium ist bei hoher Reizfrequenz in nur ungenügender Menge zur kontraktiven Aktivierung verfügbar, während bei langsamer Schlagfrequenz Aktivatorcalcium in grosser Menge vom sarkoplasmatischen Reticulum freigesetzt werden kann.

Bei der Klärung dieser scheinbar widersprüchlichen Befunde erwies sich der Einsatz des Analogmodells als ausserordentlich hilfreich. Es musste lediglich eine weitere Annahme getroffen werden, damit das kontraktile Verhaltensmuster voll mit dem Verhalten des lebenden Ventrikelmyokards übereinstimmte: Es wurde angenommen, dass Verapamil - neben seiner Hemmwirkung auf die transmembranäre Calciumversorgung - die Translokation von Calcium innerhalb des SR verlangsamt. Dazu wurde die Konstante k_3 (siehe Reaktionsschema in Abb. 15) drastisch reduziert. Diese Konstante bestimmt in der potentialabhängigen Reaktion $\beta^1 k_3$ die Wiederverfügbarkeit des Calciums, das in einem ersten Schritt während und nach der Kontraktion aus dem Cytosol in primäre Speicherorte aufgenommen wurde. Wurden zusätzlich die Reaktionskonstanten 0k_1 und 0k_7 verringert und die "recovery" (Zeitkonstante τ_r) um den Faktor 4 verlangsamt, so zeigte sich, dass die nachgebildeten inotropen Verhaltensmuster in jeder Hinsicht denen eines Verapamil-behandelten Papillarmuskels entsprachen (Abb. 42D).

Nur dieser doppelte zelluläre Angriffspunkt von Verapamil an Calciumbewegungen im Rahmen der elektromechanischen Koppelung vermag zu erklären, warum ein Papillarmuskel, der unter Verapamil bei hoher Reizfrequenz fast völlig entkoppelt ist, nach Frequenzreduktion sich sofort in einem übernormalen Ausmass kontrahieren kann (siehe Abb. 32 und 33). Es ist wohl kaum anzunehmen, dass das für die kontraktile Aktivierung nötige Ca^{2+} während des relativ kurzen Peizintervalls (ca. 5 - 10 sec

zwischen der ersten Kontraktion bei der Frequenz von 6/min und der letzten steady state Kontraktion (60/min)) in genügender Menge aus dem Extrazellulärraum zu den kontraktile Proteinen gelangt. Dagegen ist es wahrscheinlicher, dass diese Calciummenge bereits im Calciumrückbindungs- und Freisetzungssystem vorhanden ist. Dies tritt dann ein, wenn - wie postuliert - Verapamil die Translokation von Calcium zu den Freisetzungstellen (laterale Zisternen) blockiert. Dadurch akkumuliert Ca^{2+} bei kurzen Reizintervallen in den primären Rückbindungsstellen des SR.

Wie bereits ausführlich dargelegt (siehe 3.1.5, 3.2.1 und 3.2.2), ist der Prozess, der die Wiederverfügbarkeit von Calcium zur kontraktile Aktivierung (β^1k_3 im Reaktionsschema der Abb. 15) steuert, stark potential- und zeitabhängig. Ist dieser Prozess gehemmt, dann kann durch eine deutliche Verlängerung der Reizintervalle (und möglicherweise auch durch Hyperpolarisation) dem Ca^{2+} -Freisetzungssystem genügend Ca^{2+} zur Verfügung gestellt werden und damit eine ziemlich starke kontraktile Aktivierung nachfolgender Kontraktionen ermöglicht werden. Ergebnisse, die gezeigt haben, dass Verapamil die Ca^{2+} -Aufnahme vom isolierten oder semi-isolierten SR des Herzens nicht hemmt (ENTMAN, ALLEN, BORNET, GILETTE, WALLICK und SCHWARTZ, 1972; FABIATO und FABIATO, 1973), stehen keinesfalls im Widerspruch zu der Idee, dass Verapamil die potential- und zeitabhängige Calciumtranslokation zu den lateralen Zisternen des SR hemmt. Bekanntlich kann man bis heute bei Ca^{2+} -Bindungsstudien an isolierten Vesikeln des SR nur solche Messgrößen erfassen, die von der funktionellen Kontrolle des Membranpotentials unabhängig sind. Mit diesem Messsystem ist es daher bislang unmöglich, die Wiederverfügbarkeit von Ca^{2+} aus dem SR und ihre Beeinflussung durch Medikamente zu bestimmen.

Der schwache Punkt unserer Hypothese über den Wirkmechanismus von Verapamil basiert auf folgendem Problem: Muss Verapamil in die Zelle eindringen, um seine Wirkung am SR auszuüben?

Neuere Untersuchungen von MANNHOLD (1977) sprechen dafür, dass Verapamil auf Grund hoher lipophiler Eigenschaften (Verteilungskoeffizient von 140.6) prinzipiell die Voraussetzung besitzt, um die Zellmembran zu durchdringen. Auch der Befund, dass quaternisiertes Verapamil (Substanz H1)¹⁾ nicht mehr negativ inotrop wirkt, lässt die Deutung zu, dass Verapamil in die Zelle eindringt und an intrazellulären Strukturen bzw. an der Membraninnenseite angreift (MANNHOLD, 1977).

Allerdings gibt es bislang keinen direkten Nachweis dafür, dass Verapamil tatsächlich in den Intrazellulärraum gelangt. Trotzdem halten wir eine Wirkung von Verapamil auf die Calciumtranslokation am SR auch dann für möglich, wenn Verapamil lediglich am Sarkolemm angreift. Das TTS ist als Invagination des Sarkolemmes sicherlich für Verapamil zugänglich. Deshalb kann man die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass dieses Medikament an den funktionellen Verknüpfungspunkten zwischen TTS und SR (die, wie die Membranen der "disci intercalares" durch elektronendichte "tight junction" in regelmässigen Abständen in Diaden oder Triaden verbunden sind) angreift. Sollte tatsächlich eine echte "Translokation" des Ca^{2+} vom zentralen Teil des SR zu den lateralen Zisternen (die die "tight junction" mit dem TTS bilden) die Wiederverfügbarkeit von Aktivatorcalcium bestimmen, so würde sich das Medikament zwar noch im Extrazellulärraum befinden, jedoch sehr dicht an dem von uns vorgeschlagenen Wirkort. Über die Transmission der elektrischen und elektrochemischen Grundprozesse von TTS zum SR und über ihre Kontrolle der Ca^{2+} -Freisetzung und Wiederaufnahme gibt es bis heute keine schlüssigen Ergebnisse (SCHNEIDER und CHANDLER, 1973). Es ist daher nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, wie Verapamil an dieser Stelle wirken könnte.

¹⁾ Quaternisierte Verbindungen können im allgemeinen Membranen nicht passieren. Sie werden daher bei pharmakologischen Untersuchungen eingesetzt, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob ein membranwirksames Pharmakon an der Membraninnen- oder -aussenseite angreift (STRICHARTZ, 1973).

4 S C H L U S S B E M E R K U N G

=====

Die vorliegende Arbeit stellt ein Modell der elektromechanischen Koppelung in der Warmblütermyokardzelle vor, das auf einem Analogcomputer programmiert werden kann. Es beschreibt die Koppelungsprozesse auf der Basis von Calciumbewegungen in einem Multikompartimentsystem. Die zugrundeliegenden Annahmen über die einzelnen kinetischen Prozesse stützen sich - soweit verfügbar - auf experimentelle Befunde. Die mathematischen Formulierungen beschreiben notwendigerweise die beteiligten Grundmechanismen nur in sehr pauschaler Form. Dennoch vermag das Modell eine grosse Zahl inotroper Phänomene recht genau nachzubilden. Es kann daher angenommen werden, dass die Grundkonzeption des Modells richtig ist. Aus diesem Grund erscheint es auch zulässig, mit Hilfe des Modells experimentelle Ergebnisse - wenn auch mit gewisser Vorsicht - zu deuten.

Im letzten der vorangehenden Kapitel (3.6) konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass durch den Einsatz des Analogmodells das inotrope Verhaltensmuster Verapamil-behandelter Papillarmuskeln interpretierbar wird. Entgegen der bisher vertretenen Annahme, Verapamil hemme nur den langsamen (Calcium-) Einwärtsstrom, muss anhand der Wirkmusteranalyse geschlossen werden, dass Verapamil zusätzlich den Prozess verlangsamt, der nach Ablauf einer Kontraktion die Wiederverfügbarkeit von Aktivatorcalcium aus dem SR steuert.

Auf der anderen Seite sind die derzeitigen Kenntnisse über einige der im Modell enthaltenen Calciumbewegungen sicher noch recht unvollständig. Das heisst, das vorliegende Modell kann keinesfalls als vollkommenes Abbild der elektromechanischen Koppelungsprozesse verstanden werden. Es stellt lediglich eine Grundkonzeption dar, mit deren Hilfe das

sehr komplexe Wirkgefüge der elektromechanischen Kopplung des Warmblütermyokards verständlich gemacht werden soll. Das Modell ist sozusagen als "Operationsbasis" gedacht, die es erlaubt, jederzeit das eine oder andere Grundelement zu modifizieren oder zu erweitern, falls gesicherte experimentelle Daten eine ausführliche mathematische Formulierung zulassen.

Wie im Kapitel 3.2.1 ausführlich dargelegt, muss man annehmen, dass im Warmblütermyokard ein subsarkolemmal gelegenes Kompartiment mit hoher Calciumkonzentration existiert. Dieser Calciumpool konnte bisher nicht eindeutig zellulären Strukturen zugeordnet werden. Solange ein morphologischer Nachweis nicht erbracht ist, muss dieser submembranäre Calciumpool als ein funktionelles Kompartiment betrachtet werden. Dementsprechend wird dieser Calciumspeicher in der Literatur vorwiegend nach seiner funktionellen Eigenschaft als "limited space" beschrieben (BASSINGTHWAIGHTS und REUTER, 1972; REUTER, 1973a,b). Der Ausdruck "limited space" soll bedeuten, dass es sich um ein Kompartiment handelt, in dem die Ca^{2+} -Konzentration zwar hoch ist, jedoch sein Fassungsvermögen auf Grund des geringen Volumens limitiert ist.

Die Forderung nach einem derartigen subsarkolemmal gelegenen Calciumkompartiment ergibt sich aus voltage clamp-Befunden, die zeigen, dass unter Gleichgewichtsbedingungen das Umkehrpotential (E_{Ca}) des langsamen (Calcium-) Einwärtsstromes bei etwa 40 bis 50 mV, statt wie erwartet bei ca. 120 mV liegt. Berechnet man die Calciumkonzentration des intrazellulären Pools, der die treibende Kraft für den I_{Ca} bestimmt (Gleichung (2), $E_{\text{Ca}} = 40$ mV), so ergibt sich ein $(\text{Ca}^{2+})_i$ von 10^{-4} M.

Das Volumen des subsarkolemmalen Raumes lässt sich ebenfalls mit Hilfe der voltage clamp-Untersuchungen abschätzen: Geringgradige Veränderungen des langsamen Einwärtsstromes führen bereits zu deutlichen Verschiebungen des Umkehrpotentials. Aus Daten solcher Experimente kalkulierten BASSINGTHWAIGHTE und REUTER (1972), dass das Volumen des subsarkolemmalen Raumes nur etwa 0.25 % des Gesamtzellvolumens beträgt.

Einem Vorschlag von REUTER (1973b) folgend wurde in dem vorliegenden Modell angenommen, dass die Calciumelimination von diesem Kompartiment aus erfolgt. Diese Annahme ist nicht bewiesen, erscheint aber vernünftig, da ein Ca^{2+} -Efflux auf der Basis einer Na-Ca-Austauschdiffusion nur aus einem Pool mit solch hoher Ca^{2+} -Konzentration ohne Energieverbrauch möglich wäre. Dies bedeutet jedoch gleichzeitig, dass der erregungsbedingte Natriumeinwärtsstrom den Calciumefflux während der Erregung kurzfristig hemmt. Zur Absicherung dieses Postulates bedarf es jedoch noch umfassender Untersuchungen.

Auch der Prozess, der nach Ablauf einer jeden Kontraktion die Wiederverfügbarkeit des in das SR zurückgebundenen Calciums bestimmt (Restitution), ist in seinen einzelnen Reaktionsschritten bis heute nicht bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten voltage clamp-Versuche (3.1.5) und die Ergebnisse anderer (GIBBONS und FOZZARD, 1971, 1975b; REUTER, 1973b; TRAUTWEIN, McDONALD und TRIPATHI, 1975) können die Potential- und Zeitabhängigkeit des Restitutionsprozesses nur formal beschreiben. Das liegt daran, daß bis heute bei Untersuchungen an isolierten Vesikeln des SR nur die Reaktionsmechanismen der Ca^{2+} -Rückbindung bzw. -aufnahme in das SR studiert werden können. Nachgeschaltete Prozesse, die wie die Restitution (und auch die Ca^{2+} -Freisetzung

aus dem SR) unter der Kontrolle des Membranpotentials - ablaufen, sind in vitro nicht nachvollziehbar; es sei denn, es gelingt bei diesen Experimenten die bioelektrische Kontrolle der Myokardzellmembran zu erhalten oder zu "imitieren". Auch unsere Kenntnis über die Verknüpfung der Erregung der äusseren Zellmembran mit den potentialabhängigen Calciumbewegungen im SR ist noch sehr gering. Es wird zwar allgemein angenommen, dass die Erregung der äusseren Zellmembran (zu der auch das Sarkolemm des TTS zu rechnen ist) im Bereich der Triaden auf das SR übertragen wird, jedoch gibt es zur Transmission der elektrischen und elektrochemischen Grundprozesse und ihrer Kontrolle des Restitutionsvorganges (und auch der Ca^{2+} -Freisetzung) keine schlüssigen Ergebnisse (siehe dazu auch SCHNEIDER und CHANDLER, 1973) .

In diesem Zusammenhang sind voltage clamp-Ergebnisse interessant, die zeigen, dass die Zeitkonstante des Restitutionsprozesses und der recovery from inactivation des langsamen Einwärtsstromes etwa gleich sind und auch in sehr ähnlicher Weise vom Membranpotential abhängen (REUTER, 1973b; TRAUTWEIN, McDONALD und TRIPATHI, 1975). Dies könnte bedeuten, dass dieselben Prozesse, die die Erholungskinetik des langsamen Membrankanals bestimmen, gleichzeitig die Wiederverfügbarkeit von Aktivatorcalcium aus dem SR kontrollieren. Diese Vermutung wird durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt: Der Calciumantagonist Verapamil hemmt nämlich sowohl die recovery der I_{Ca} als auch den Restitutionsprozess (siehe Kapitel 3.4 ; 3.5 ; 3.6). Es ist also durchaus denkbar, dass Verapamil - trotz seiner Doppelwirkung - nur über einen einzigen Angriffspunkt an koppelungswirksamen Calciumbewegungen in der Myokardzelle verfügt.

Die Befunde von GIBBONS und FOZZARD stehen allerdings im Gegensatz zu dieser Annahme. Diese Autoren fanden bei ihren

voltage clamp-Untersuchungen an isolierten Schafspurkinjefäden, dass der Vorgang der Restitution viel langsamer verläuft als die recovery from inactivation des langsamen (Calcium-) Einwärtsstromes. Nicht zuletzt aufgrund dieser Widersprüche wurde im vorliegenden Modell für beide Prozesse voneinander unabhängige Reaktionen postuliert, die jedoch in ihrer Kinetik und Potentialabhängigkeit sehr ähnlich sind.

In der vorliegenden Form macht das Modell auch noch keine Aussagen über Rückkoppelungsmechanismen zwischen mechanischen Ereignissen an den kontraktilen Proteinen und vorgeschalteten Schritten der elektromechanischen Koppelung.

Schon lange ist bekannt, dass der Verlauf und die Intensität einer Einzelzuckung von den Bedingungen abhängt, unter denen sie abläuft. Als generelle Regel gilt, dass unter isometrischen Bedingungen, die Dauer des "active state" verlängert wird, während er unter isotonischen Kontraktionsbedingungen abgekürzt wird. Dies gilt sowohl für den Skelettmuskel (FENN, 1923; JEWELL und WILKIE, 1960; HILL, 1964) als auch für den Herzmuskel des Warmblüters (ABBOTT und MOMMAERTS, 1959; BRADY, 1965; EDMAN und NILSON, 1969).

Beim Myokard führt während einer Kontraktion jede Längenänderung des Muskels sofort zu einem Abfall der Kontraktionsamplitude und zwar unabhängig davon, ob der Muskel sich aktiv verkürzt oder passiv gedehnt wird. Im Vergleich zum Skelettmuskel ist beim Warmblütermysokard dieser Effekt so stark ausgeprägt, dass man von einer Entkoppelung (BRADY, 1965) sprechen kann. Der BRADY-Effekt ist umso stärker ausgeprägt, je später nach der Reizung die Längenänderung erfolgt, je grösser die Längenänderung ist und je länger die Verkürzung

dauert (KAUFMANN, BAYER und HARNASCH, 1972). Verkürzt sich der Muskel andererseits gegen eine zunehmende Nachbelastung oder wird die Verkürzung durch eine isometrische Kontraktionsperiode unterbrochen (Anschlagszuckung), dann verlängert sich die Dauer der mechanischen Aktivität erheblich.

Auf Grund dieser Zusammenhänge darf man annehmen, dass im Herzmuskel - wesentlich ausgeprägter als im Skelettmuskel - ein Rückkoppelungssystem existiert, in dem entweder die mechanische Spannungsentwicklung positiv oder die Längenänderung negativ auf das kontraktile System bzw. dessen vorgeschaltete Aktivierungsmechanismen zurückwirkt. Dieses Feedbacksystem stellt eine Art "innere Kontraktilitätskontrolle" dar, das sehr schnell - allerdings für nur jeweils einen Kontraktionszyklus - wirksam ist.

Dieses regulative System muss klar von einem anderen autoregulativen Phänomen unterschieden werden, das offenbar auf einer Rückkoppelungsschleife vom Kontraktionsprozess zur elektrischen Erregung beruht und sich daher über mehrere aufeinander folgende Schläge auswirkt (KAUFMANN, HENNEKES, LAB und KRAUSE, 1971; HENNEKES, LAB, KAUFMANN und STEINER, 1977; HENNEKES, KAUFMANN und STEINER, 1977). Diese mechano-elektrische Rückkoppelung arbeitet in der Weise, dass jede Verkürzung der kontraktilen Elemente zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer führt, wodurch die Intensität der nachfolgenden Schläge treppenförmig zunimmt. Andererseits werden beim Übergang von isotonischen auf isometrische Kontraktionsbedingungen die Aktionspotentiale abgekürzt, woraus während der folgenden Schläge ein negativer Treppeneffekt resultiert (siehe dazu auch ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; WOOD, HEPPNER und WEIDMANN, 1969).

Zur Zeit ist es noch sehr schwierig, ein klares Konzept zu entwickeln, wie diese beiden Regelsysteme arbeiten. In neu-

en experimentellen Untersuchungen konnte HENNEKES (HENNEKES, LAB, KAUFMANN und STEINER, 1977; HENNEKES, KAUFMANN und STEINER, 1977) nachweisen, dass beide Systeme - der BRADY-effekt und die mechano-elektrische Rückkoppelung - allein von der Verkürzung des kontraktiven Elementes kontrolliert werden. Im Rahmen dieser umfangreichen Untersuchungen konnte ein weiterer Rückkoppelungsmechanismus aufgezeigt werden, der kooperativ zur mechano-elektrischen Rückkoppelung arbeitet. Wie die mechano-elektrische Rückkoppelung wirkt sich dieser Mechanismus auf mehrere aufeinander folgende Schläge aus. Der kontrollierende Parameter ist hier allerdings nicht die Verkürzung, sondern die Muskellänge, bei der die Kontraktion stattfindet. Die Dauer des Aktionspotentials wird bei diesem Rückkoppelungsprozess nicht verändert. In Übereinstimmung mit Befunden von FABIATO und FABIATO (1975) wird angenommen, dass die Muskellänge das Ausmass der Calciumfreisetzung aus dem SR mitbestimmt, in dem Sinne, dass eine geringe Muskellänge die Freisetzung von Aktivatorcalcium hemmt, eine grosse Muskellänge sie fördert.

Trotz dieser neuen Befunde ist eine Beschreibung und Deutung dieser Rückkoppelungsprozesse im aktuellen Grundkonzept der elektromechanischen Koppelung des Warmblütermyokards zur Zeit noch nicht möglich. Sicherlich müssen hierzu mehr Informationen über die beteiligten Grundmechanismen zur Verfügung stehen. Es ist jedoch abzusehen, dass hierzu in naher Zukunft eine Reihe grundlegender Erkenntnisse gewonnen werden, die es gestatten sollten, das hier vorgestellte Modell im Hinblick auf die mechano-elektrischen Rückkoppelungsprozesse zu erweitern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1) An isolierten Katzenpapillarmuskeln wurde mit Hilfe von voltage clamp-Untersuchungen (Doppel-Saccharosetrennwand-Technik) die Abhängigkeit der kontraktilen Aktivität vom Membranpotential, von den transmembranären Einwärtsströmen und von Frequenz und Dauer depolarisierender Klemmschritte untersucht.

2) Bei schrittweiser Depolarisation der Membran wird eine wohldefinierte Schwelle zur Auslösung einer kontraktilen Antwort gefunden. Diese mechanische Schwelle fällt mit dem Membranpotential zusammen, bei dem der schnelle Einwärtsstrom (I_{Na}) ausgelöst wird. Variation von $(Ca^{2+})_o$ verändert weder die mechanische Schwelle, noch die Schwelle für den I_{Na} . Langsame depolarisierende Klemmschritte verschieben mit abnehmender Depolarisationsgeschwindigkeit beide Schwellen zu weniger negativen Membranpotentialwerten. Bei Anwendung sehr langsamer depolarisierender Klemmschritte, die den I_{Na} nicht aktivieren, wird keine phasische mechanische Antwort beobachtet. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass am Warmblütermyokard - ähnlich wie beim Skelettmuskel - der schnelle Natriumeinwärtsstrom die Freisetzung von Aktivatorcalcium aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums(SR) auslöst.

3) Die Beziehung zwischen Kontraktionskraft im steady state und Membranpotential rhythmischer depolarisierender Klemmschritte verläuft etwa parallel zum langsamen Calciumeinwärtsstrom (I_{Ca}). Die S-förmige Beziehung durchläuft etwa beim Null-Potential ein Maximum und fällt bei positiven Membranpotentialwerten wieder ab. Aus diesem Befund wird der Schluß gezogen, daß die potentialabhängige Zunahme der Kon-

traktionskraft das Zeitintegral der transmembranären Calciumversorgung durch den I_{Ca} reflektiert.

4) Bei Verlängerung überschwelliger depolarisierender Klemmschritte nimmt unter Gleichgewichtsbedingungen die Kraftentwicklung zu und erreicht bei 500-700 ms Depolarisationsdauer ein Maximum. Die maximale Kraftentwicklung hängt ihrerseits wieder vom Membranpotential ab. Anhand der Ergebnisse wird die Abhängigkeit der Kraftentwicklung vom Membranpotential und der Depolarisationsdauer in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Darüberhinaus kann gezeigt werden, dass auch sehr langdauernde Membrandepolarisationen (bis 10 sec) üblicherweise keine tonischen Kontraktionen bewirken.

5) Soll nach Ablauf einer Aktivierung durch eine überschwellige Membrandepolarisation, durch einen gleichartigen Klemmschritt eine zweite Kontraktion gleicher Höhe ausgelöst werden, so muss vor der Auslösung der zweiten Aktivierung die Membran für eine jeweils gegebene Zeit auf ein jeweils gegebenes Potentialniveau repolarisiert werden. Die Amplituden der Kontraktionen, die durch solche depolarisierende Zweit-Klemmschritte ausgelöst werden, hängen in charakteristischer Weise von der Dauer des Depolarisationsintervalls und dem Membranpotential während dieser Phase ab.

6) Anhand der Ergebnisse aus den voltage clamp-Experimenten und aus der Literatur verfügbarer Daten, wird eine Modellvorstellung zur elektromechanischen Koppelung der Warmblütermyokardzelle entwickelt und in Form von Calciumkinetiken auf einem Analogcomputer programmiert.

7) Calciumbewegungen finden zwischen sechs Kompartimenten statt: Extrazellulärraum, Sarkoplasma, Mitochondrien, Ca-Rückbindungsarten im SR, Ca-Freisetzungsarten im SR und

einem kleinen subsarkolemmal gelegenen Raum.

8) Der langsame transmembranäre (Calcium-) Einwärtsstrom wird in Form modifizierter Hodgkin-Huxley-Kinetiken programmiert.

9) Das Modell basiert im wesentlichen auf folgenden Postulaten: Der potentialabhängige Calciumeinstrom während eines Aktionspotentials ist zu gering, um eine ausreichende kontraktile Aktivierung zu gewährleisten. Es wird daher angenommen, daß die Amplitude einer Einzelkontraktion hauptsächlich durch die Calciummenge bestimmt wird, die aus dem SR freigesetzt werden kann. Auslöser für diese Ca^{2+} -Freisetzung ist die - vermutlich über das TTS - radial ins Zellinnere fortgeleitete Membrandepolarisation. Zur Muskelerschlaffung wird Calcium in primäre Bindungsstellen im SR zurückgebunden. Diese Stellen sind vermutlich nicht identisch mit denjenigen, in denen Calcium endgültig gespeichert wird. Damit Calcium für eine erneute kontraktile Aktivierung wieder freigesetzt werden kann, muss es von den primären Rückbindungsstellen in die Speicher- und Freisetzungsorte des SR (laterale Zisternen) transloziert werden. Die Geschwindigkeit dieses Schrittes wird vom Membranpotential kontrolliert. Der Calciumefflux geschieht in Form einer Na-Ca-Austauschdiffusion. Dabei wird postuliert, dass der Calciumefflux über einen subsarkolemmal gelegenen Raum mit hoher Calciumkonzentration stattfindet.

10) Das Verhalten des Modells wird mit dem des lebenden Warmblütermyokards verglichen. Es kann gezeigt werden, daß das Modell folgende inotrope Phänomene exakt nachbilden kann: Amplituden-Frequenzbeziehung im steady state; Treppenphänomene, die nach plötzlicher Änderung der Reizfrequenz oder der Aktionspotentialdauer auftreten; postextrasystolische Potenzierung; Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Test-

kontraktionen; Nachkontraktionen.

11) An isolierten Katzenpapillarmuskeln wird die Wirkung von Verapamil, D 600 und anderer calciumantagonistischer Massnahmen auf das kontraktile und elektrische Verhalten untersucht. Anhand der Wirkmuster soll nachgewiesen werden, dass ein gemeinsamer Angriffsort organischer und anorganischer Calciumantagonisten auf Prozesse der elektromechanischen Koppelung unwahrscheinlich ist. Durch den Einsatz des Analogmodells der elektromechanischen Koppelung soll versucht werden, den oder die Wirkorte von Verapamil an der Warmblüterm yokardzelle zu bestimmen.

12) Bei niedriger Reizfrequenz reduzieren Verapamil und D 600 die Kontraktionsamplituden nur wenig, während bei hoher Reizfrequenz ein starker negativ inotroper Effekt eintritt. Erhöhung von $(Ca^{2+})_o$ erhöht zwar die Kontraktionsamplituden bei allen Reizfrequenzen, kann aber die Verapamil- (und D 600-) Wirkung nicht beseitigen. Bei plötzlicher Frequenzerhöhung kommt es zu einer schnellen negativen Treppe, der ein sehr langsamer Wiederanstieg der Kontraktionsamplituden folgt.

13) Partieller Ca^{2+} -Entzug, Zugabe von Ni^{2+} oder La^{3+} bewirken - im Gegensatz zu Verapamil (und D 600) - bei allen Reizfrequenzen gleichstarke negativ inotrope Effekte. Bei plötzlicher Frequenzsteigerung kommt es - wie unter Kontrollbedingungen - zu positiven Treppen.

14) Im Gegensatz zu den Effekten von Ni^{2+} , La^{3+} und partiellem Ca^{2+} -Entzug flacht Verapamil die Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen ab. Dies lässt vermuten, dass Verapamil den Restitutionsprozess verlangsamt, der die Wiederverfügbarkeit von Aktivatorcalcium aus den intra-

zellulären Speichern des SR kontrolliert.

15) Die Kraft-Geschwindigkeitsbeziehungen werden durch Verapamil und partiellen Ca^{2+} -Entzug in ähnlicher Weise beeinflusst: Die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit ($V_{\max}$) wird nur wenig reduziert, die maximale Kraftentwicklung (P_0) dagegen stark. Es wird geschlossen, dass Verapamil die Calciummenge reduziert, die den kontraktilen Proteinen zur Aktivierung angeboten wird, jedoch den Elementarprozess der Aktin-Myosin-Interaktion nicht beeinflusst.

16) Anhand von voltage clamp-Untersuchungen wird gezeigt, dass Verapamil den langsamen (Calcium-) Einwärtsstrom nur bei hoher Reizfrequenz reduziert. Die Reduktion des langsamen Einwärtsstromes bei hoher Reizfrequenz beruht auf einer Verlangsamung der recovery from inactivation. Der starke Plateauverlust monophasischer Aktionspotentiale, der unter Verapamileinwirkung bei hoher Reizfrequenz auftritt, wird auf die frequenzabhängige Hemmung des langsamen Einwärtsstromes zurückgeführt.

17) Zur Nachbildung des inotropen Verhaltensmusters Verapamil-behandelter Papillarmuskeln bedarf es folgender Änderungen im Rechenprogramm des Analogmodells: Der langsame Einwärtsstrom muss generell reduziert und die Zeitkonstante der recovery from inactivation des langsamen Einwärtsstromes vergrößert werden. Darüberhinaus muss die Reaktion, die nach Ablauf einer Kontraktion die Wiederverfügbarkeit von Aktivatorcalcium aus dem SR steuert, verlangsamt werden.

6 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

ABBOTT, B.C., MOMMAERTS, W.F.H.M. (1959)

A study of inotropic mechanisms in the papillary muscle preparation.

J. Gen. Physiol. 42, 533-551

ADRIAN, R.H., COSTANTIN, L.L., PEACHEY, L.D. (1969)

Radial spread of contraction in frog muscle fibers.

J. Physiol. (Lond.) 204, 231-257

ANDERSON, P.A.W., MANRING, A., JOHNSON, E.A. (1973)

Force-frequency relationship. A basis for a new index of cardiac contractility?

Circ. Res. 33, 665-671

ANDERSSON-CEDERGREEN, E. (1959)

Ultrastructure of motor endplate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstruction from serial sections.

J. Ultrastruct. Res. (Suppl. 1), 1-191

ANTONI, H., ENGSTFELD, G., FLECKENSTEIN, A. (1962)

Die Mg^{++} -Lähmung des isolierten Froschmyokards. Ein Beitrag zur Frage der Beziehung zwischen Aktionspotential und Kontraktion.

Pfluegers Arch. 275, 507-525

ANTONI, H., JAKOB, R., KAUFMANN, R. (1969)

Mechanische Reaktionen des Frosch- und Säugetiermyokards bei Veränderungen der Aktionspotential-Dauer durch konstante Gleichstromimpulse.

Pfluegers Arch. 306, 33-57

BAKER, P.F. (1972)

Transport and metabolism of calcium ions in nerve.

Prog. Biophys. Mol. Biol. 24, 177-223

BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., HODGKIN, A.L., STEINHARDT, R.A. (1969)

The influence of calcium on sodium efflux in squid axons.

J. Physiol. (Lond.) 200, 431-458

BAKER, P.F., GLITSCH, H.G. (1973)

Does metabolic energy participate directly in the Na^{+} -dependent extrusion of Ca^{2+} -ions from squid axons?

J. Physiol. (Lond.) 233, 44-46

BAKER, P.F., MEVES, H., PIDGWAY, E.B. (1973)

Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarization of squid axons.

J. Physiol. (Lond.) 231, 511-526

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., BEELEP, G.W., SIDELL, P.M., PEUTER, H., SAFFORD, P.E. (1973)

A model for calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells.

In: Regulation and control in physiological systems. pp. 36-38, Proceedings ISA: Pittsburg.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., FRY, C.H. McGUIGAN, J.A.S. (1976)
Relationship between internal calcium and outward current in
mammalian ventricular muscle; a mechanism for the control of
the action potential duration.
J. Physiol. (Lond.) 262, 15-37

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., REUTER, H. (1972)
Calcium movements and excitation-contraction coupling in
cardiac cells.
In: Electrical phenomena in the heart. pp. 353-395; ed. W.C.
de Mello, Academic Press: London-New York.

BAUTOVICH, G., GIBBS, D.G., JOHNSON, E.A. (1962)
The force of contraction of the rabbit papillary muscle pre-
paration as a function of the frequency and pattern of sti-
mulation.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 40, 455-472

BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMANN, P., MANNHOLD, P. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and
D 600 in mammalian myocardium I. Pattern of inotropic effects
of the racemic compounds.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 49-68

BAYER, R., KALUSCHE, D., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and
D 600 in mammalian myocardium III. Effects of the optical
isomers on transmembrane action potentials.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 81-97

BAYER, R., KAUFMANN, R. (1973)
On line analysis of force-velocity-length (PVL) and force-
velocity-time (PVT) relations in isolated papillary muscles
with a digital data acquisition and display unit II.
Pfluegers Arch. (Suppl.) 343, R 21

BAYER, R., KAUFMANN, R., GUDJONS, M. (1977)
Does diphenylhydantoin inhibit the slow channel in cardiac
membrane? Inotropic and electrophysiological actions in iso-
lated cat myocardium.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. zur Publikation einge-
reicht.

BAYER, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and
D 600 in mammalian myocardium II. Pattern of inotropic effects
of the optical isomers.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 69-80

BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., EHARA, T., MANNHOLD, P. (1976)
Comparative studies of inotropic and electrophysiological
effects of "slow channel inhibitors" in isolated mammalian
cardiac muscle.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (Suppl.) 293, R 21

- BEELEER, G.W., REUTER, H. (1970a)
Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres.
J. Physiol. (Lond.) 207, 165-190
- BEELEER, G.W., REUTER, H. (1970b)
Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres.
J. Physiol. (Lond.) 207, 191-209
- BEELEER, G.W., REUTER, H. (1970c)
The relation between membrane potential, membrane currents
and activation of contraction in ventricular myocardial fibres.
J. Physiol. (Lond.) 207, 211-229
- BELZ, G.G., BENDER, F. (1974)
Therapie der Herzrhythmusstörungen mit Verapamil.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- BENEKEN, J.E.W., De WIT, B. (1967)
Physical base of circulatory transport: regulation and exchange.
W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- BENNET, H.S., PORTER, K.R. (1953)
An electron microscopic study of sectioned breast muscle of
the domestic fowl.
Amer. J. Anat. 93, 61-105
- BENNINGER, C., EINWÄCHTER, H.M., HAAS, H.G., KERN, R. (1976)
Calcium-sodium antagonism on the frog's heart: a voltage clamp
study.
J. Physiol. (Lond.) 259, 617-645
- BIANCHI, C.P., SHANES, A.M. (1959)
Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity
and during potassium contracture.
J. Gen. Physiol. 42, 803-815
- BLINKS, J.R., KOCH-WESER, J. (1961)
Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon
myocardial contractility.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 134, 373-389
- BLINKS, J.R. KOCH-WESER, J. (1963)
Physical factors in the analysis of the actions of drugs on
myocardial contractility.
Pharmacol. Rev. 15, 531-599
- BOWDITCH, H.P. (1871)
Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel-
fasern des Herzens zeigen.
Ber. sächs. Ges. (Akad.) Wiss. 652-689

BRADY, A.J. (1965)

Time and displacement dependence of cardiac contractility: problems in defining the active state and force-velocity relations.

Fed. Proc. 24, 1410-1420 (1965)

BRAVENY, P., KRUTA, U. (1958)

Dissociation de deux facteurs: restitution et potentiation dans l'action de l'intervalle sur l'amplitude de la contraction du myocarde.

Arch. Int. Physiol. Biochim. 66, 633-652

BROWN, A.M., BROWN, H.M. (1973)

Light response of a giant Aplysia neuron.

J. Gen. Physiol. 62, 239-254

BRUTSAERT, D.L., CLAES, V.A., GOETHALS, M.A. (1973)

Effect of calcium on force-velocity-length relations of heart muscle of the cat.

Circ. Res. 33, 385-391

BRUTSAERT, D.L., CLAES, V.A., SONNENBLICK, E.H. (1971)

Velocity of shortening of unloaded heart muscle and the length-tension relation.

Circ. Res. 29, 63-75

BRUTSAERT, D.L., SONNENBLICK, E.H. (1969)

Force-velocity-length-time relations of the contractile elements in heart muscle of the cat.

Circ. Res. 24, 137-149

CHAPMAN, R., LEOTY, C. (1976)

The time-dependent and dose-dependent effects of caffeine on the contraction of the ferret heart.

J. Physiol. (Lond.) 256, 287-314

COSMOS, E., HARRIS, E.J. (1961)

In vitro studies of the gain and exchange of calcium in frog skeletal muscle.

J. Gen. Physiol. 44, 1121-1130

COSTANTIN, L.L. (1970)

The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers.

J. Gen. Physiol. 55, 703-715

COSTANTIN, L. (1971)

Biphasic potassium contractures in frog muscle fibers.

J. Gen. Physiol. 58, 117-130

CUERVO, L.A., ADELMAN, W.J. (1970)

Equilibrium and kinetic properties of the interaction between tetrodotoxin and the excitable membrane of the squid giant axon.

J. Gen. Physiol. 55, 309-335

- DECK, K.A., KERN, R., TRAUTWEIN, W. (1964)
Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibers.
Pfluegers Arch. 280, 50-62
- DECK, K.A., TRAUTWEIN, W. (1964)
Ionic currents in cardiac excitation.
Pfluegers Arch. 280, 63-80
- DIPOLO, R. (1973)
Calcium efflux from internally dialyzed squid giant axons.
J. Gen. Physiol. 62, 575-589
- EBASHI, S. (1961)
Calcium binding activity of vesicular relaxing factor.
J. Biochem. 50, 236-244
- EBASHI, S., ENDO, M. (1968)
Calcium ion and muscle contraction.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 18, 125-183
- EBASHI, S., LIPMANN, F. (1962)
Adenosine-triphosphate linked concentration of calcium ions
in a particulate fraction of rabbit muscle.
J. Cell. Biol. 14, 389-400
- EBASHI, S., MASAKI, T., TSUKUI, R. (1974)
Cardiac contractile proteins. In: The myocardium.
Adv. Cardiol. 12, 59-69
- EBASHI, S., OHTSUKI, I., MIHASHI, K. (1972)
Regulatory proteins of muscle with special reference to
troponin.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 215-223
- EDMAN, K.A.P., NILSSON, E. (1969)
The dynamics of the inotropic change produced by altered
pacing of rabbit papillary muscle.
Acta Physiol. Scand. 76, 230
- EISENBERG, R.S., GAGE, P.W. (1969)
Ionic conductances of the surface and transverse tubular
membranes of frog sartorius fibres.
J. Gen. Physiol. 53, 279-297
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970)
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic
reticulum of skinned skeletal muscle fibres.
Nature 228, 34-36
- ENTMAN, M.L., ALLEN, J.C., BORNET, E.P., GILLETTE, P.C.,
WALLICK, E.T., SCHWARTZ, A. (1972)
Mechanism of calcium accumulation and transport in car-
diac relaxing system (sarcoplasmic reticulum membranes):
effects of verapamil, D-600, X537A and A23187.
J. Mol. Cell. Cardiol. 4, 681-687

FABIATO, A., FABIATO, F. (1972)

Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers. with disrupted or closed sarkolemmas. Calcium dependent cyclic and tonic contractions.

Circ. Res. 31, 293-307

FABIATO, A., FABIATO, F. (1973)

Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs.

Eur. J. Cardiol. 1/2, 143-155

FABIATO, A., FABIATO, F. (1975)

Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.

J. Physiol. (Lond.) 249, 469-495

FABIATO, A., FABIATO, F. (1975b)

Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarkomere length.

Nature 256, 54-56

FALK, G. (1968)

Predicted delays in the activation of the contractile system.

Biophys. J. 8, 608-625

FAWCETT, D.W., McNUTT, N.S. (1969)

Ultrastructure of the cat myocardium: I Ventricular papillary muscle.

J. Cell. Biol. 42, 1-45

FENN, W.O. (1923)

A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius of the frog.

J. Physiol. (Lond.) 58, 175

FLECKENSTEIN, A. (1971)

Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions.

In: Calcium and the heart. pp. 135-188. Ed. P. Harris and L. Opie. Academic Press: London-New York.

FLECKENSTEIN, A., GRÜN, G., TRITTHART, H., BYON, K., HARDING, P. (1971)

Uterus-Relaxation durch hochaktive Ca^{2+} -antagonistische Hemmstoffe der elektro-mechanischen Koppelung wie Isoptin (Verapamil, Iproveratril), Substanz D 600 und Segontin (Prenylamin).

Klin. Wschr. 49, 32-41

- FLECKENSTEIN, A., KAMMERMEIER, H., DÖRING, H.J., FREUND, H.J. (1967)
Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatatoren mit gleichzeitig Sauerstoff-einsparenden Myokard-Effekten, Pre-nylamin und Iproveratril.
Z. Kreis.-Forsch. 56, 716-744; 839-858
- FORD, L.E., PODOLSKY, R.J. (1970)
Regenerative calcium release within muscle cells.
Science 167, 58-59
- FORSSMANN, W.G., GIRARDIER, L. (1970)
A study of the T-system in rat heart.
J. Cell. Biol. 44, 1-19
- FOZZARD, H.A., HELLMAN, D.C. (1968)
Relationship between membrane voltage and tension in voltage clamped cardiac Purkinje fibres.
Nature (Lond.) 218, 588-589
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1973)
Membranous systems in muscle fibers.
In: The structure and function of muscle.
Vol. II, part 2, pp. 531-619, Ed. G.H. Bourne, Academic Press: New York-London.
- GAGE, P.W., EISENBERG, R.S. (1967)
Action potentials without contraction in frog, skeletal muscle fibers with disrupted transverse tubules.
Science 158, 1702-1703 (1967)
- GETTES, W., REUTER, H. (1974)
Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres.
J. Physiol. (Lond.) 240, 703-724
- GIBBONS, W.R., FOZZARD, H.A. (1971)
Voltage dependence and time dependence of contraction in sheep cardiac Purkinje fibers.
Circ. Res. 28, 446-460
- GIBBONS, W.R., FOZZARD, H.A. (1975a)
Relationships between voltage and tension in sheep cardiac Purkinje fibers.
J. Gen. Physiol. 65, 345-365
- GIBBONS, W.R., FOZZARD, H.A. (1975b)
Slow inward current and contraction of sheep cardiac Purkinje fibers.
J. Gen. Physiol. 65 367-384

- GLITSCH, H.G., REUTER, H., SCHOLZ, H. (1970)
The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles.
J. Physiol. (Lond.) 209, 25-43
- GOTO, M., KIMOTO, Y., KATO, Y. (1971)
A study on the excitation-contraction coupling of the bull-frog ventricle with voltage clamp technique.
Jpn. J. Physiol. 21, 159-173
- HAAS, H.G., KERN, R., EINWÄCHTER, H.M. (1970)
Electrical activity and metabolism in cardiac tissue. An experimental and theoretical study.
J. Membr. Biol. 3, 180-209
- HAAS, H.G., KERN, R. (1971)
Membrane currents and contraction in frog heart.
Proc. XXV Int. Congr. Phys. Sciences, Munich 1971, p.226
- HASSELBACH, W., MAKINOSE, M. (1961)
Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung.
Biochem. Z. 333, 518-528
- HASSELBACH, W., MAKINOSE, M. (1963)
Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums.
Eur. J. Biochem. 339, 94-111
- HASSELBACH, W., WEBER, H.H. (1965)
Die intrazelluläre Regulation der Muskelaktivität.
Naturwissenschaften 52, 121-131
- HENNEKES, R., KAUFMANN, R., STEINER, R. (1977)
Why does the cardiac force-velocity relationship not follow a Hill-hyperbola? Possible implications of feedback loop involved in cardiac excitation-contraction coupling.
J. Cell. Mol. Cardiol. im Druck.
- HENNEKES, R., LAB, R., KAUFMANN, R., STEINER, R. (1977)
Feedback loops involved in cardiac excitation-contraction coupling: evidence for two different pathways.
J. Mol. Cell. Cardiol. (im Druck)
- HILL, A.V. (1948)
On the time required for diffusion and its relation to processes in muscle.
Proc. Roy. Soc. Lond. B. 135, 446-453
- HILL, A.V. (1964)
The effect of tension in prolonging the active state in a twitch.
Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 159, 589-

HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1960a)

The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres.

J. Physiol (Lond.) 153, 370-385

HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1960b)

Potassium contractures in single muscle fibres.

J. Physiol. (Lond.) 153, 386-403

HODGKIN, A.L., HUXLEY, . (1952)

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.

J. Physiol (Lond.) 117, 500-544

HOFFMAN, H. (1968)

Klinische Untersuchungen zur Wirkung von Iproveratril bei Koronarinsuffizienz und zur sympathikolytischen Beeinflussung der Myokardfunktion.

Zschr. inn. Med. 23, 357-364

HOMBURGER, H., SCHLEIERMACHER, W., ANTONI, H. (1973)

Time course of postextrasystolic potentiation in isolated atrial and ventricular myocardium of guinea-pig as influenced by changes in frequency, in calcium, and by caffeine.

Pfluegers Arch., Suppl. 339, R 5

HUTTER, O.F., NOBLE, D. (1960)

Rectifying properties of cardiac muscle.

Nature (Lond.) 188, 495

HUXLEY, A.F., TAYLOR, R.E. (1958)

Local activation of striated muscle fibers.

J. Physiol (Lond.) 144, 426-441

ISENBERG, G. (1975)

Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by $[Ca]_i$?

Nature (Lond.) 253, 273-274

JEWELL, B.R., WILKIE, D.R. (1960)

The mechanical properties of relaxing muscle.

J. Physiol. (Lond.) 152, 30

JÖBSIS, F.F., O'CONNOR, M.J. (1966)

Calcium release and reabsorption in the sartorius muscle of the toad.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 246-252

JOHNSON, E.A., ROWE, M.J., VAUGHAN, P.C.A. (1964)

A quantitative description of the short term changes in the force of contraction of rabbit papillary muscle with the pattern of stimulation.

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 42, 197-205

- JUNDT, H., PORZIG, H., REUTER, H., STUCKI, J.W. (1975)
The effect of substances releasing intracellular calcium ions on sodium-dependent calcium efflux from guinea-pig auricles. *J. Physiol. (Lond.)* 246, 229-253
- KALTENBACH, M., ZIMMERMANN, D. (1968)
Zur Wirkung von Iproveratril auf die Angina pectoris und die adrenergischen β -Rezeptoren des Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 93, 25-28
- KASS, R.S., TSIEN, R.W. (1976)
Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibers.
J. Gen. Physiol 67, 599-617
- KATZ, A.M. (1973)
Contractile proteins.
In: The mammalian myocardium. pp. 52-80. Ed. Langer und Brady, John Wiley & Sons: New York-London-Sidney-Toronto.
- KATZUNG, B.G., REUTER, H., PORZIG, H. (1973)
Lanthanum inhibits Ca inward current but not Na-Ca exchange in cardiac muscle.
Experientia 29, 1073-1075
- KAUFMANN, R., BAYER, R., HARNASCH, C. (1972)
Autoregulation of contractility in the myocardial cell. Displacement as a controlling parameter.
Pfluegers Arch. 332, 96-116
- KAUFMANN, R., BAYER, R. (1973)
On line analysis of force-velocity-length (PVL) and force-velocity-time (PVT) relations in isolated papillary muscles with a digital data acquisition and display unit. I.
Pfluegers Arch. Suppl. 343, R 21
- KAUFMANN, R., BAYER, R., FÜRNISS, T., KRAUSE, H., TRITTHART, H. (1974)
Calcium-movement controlling cardiac contractility II. Analog computation of cardiac excitation-contraction coupling on the basis of calcium kinetics in a multi-compartment model.
J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 543-559
- KAUFMANN, R., FLECKENSTEIN, A. (1965)
Die Bedeutung der Aktionspotential-Dauer und der Ca^{++} -Ionen beim Zustandekommen der positiv-inotropen Kältewirkungen am Warmblüter-Myokard.
Pfluegers Arch. 285, 1-18
- KAUFMANN, R., HOMBURGER, H., TRITTHART, H. (1969)
Spezifische Hemmung des Erschlaffungsprozesses am stark gekühlten Warmblütermyokard (10°C - 10°C).
Pfluegers Arch. 305, 1-8

KAUFMANN, R., LAB, M.J., HENNEKES, R., KRAUSE, H. (1971)
Feedback interaction of mechanical and electrical events in
the isolated mammalian ventricular myocardium (cat papillary
muscle).

Pfluegers Arch. 324, 100-123

KAUFMANN, R., FLECKENSTEIN, A., ANTONI, H. (1963)
Ursachen und Auslösungsbedingungen von Myokardkontraktionen
ohne reguläres Aktionspotential.

Pfluegers Arch. 278, 435-440

KAVALER, F. (1959)

Membrane depolarization as a cause of tension development in
mammalian ventricular muscle.

Am. J. Physiol. 197, 968-970

KOCH-WESER, J., BLINKS, J.R. (1963)

The influence of the interval between beats on myocardial con-
tractility.

Pharmacol. Rev. 15, 601-652

KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H., FLECKENSTEIN, A. (1972)

Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in
mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.

Pfluegers Arch. 335, 309-322

KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H., FLECKENSTEIN, A. (1973)

Selective inhibition of the transmembrane Ca-conductivity of
mammalian myocardial fibres by Ni, Co and Mn ions.

Pfluegers Arch. 338, 115-123

KOHLHARDT, M., KRAUSE, H., KÜBLER, M., HERDEY, A. (1975)

Kinetics of inactivation and recovery of the slow inward current in
the mammalian ventricular myocardium.

Pfluegers Arch. 355, 1-17

KOHLHARDT, M., KÜBLER, M., HERDEY, A. (1974)

Characteristics of the recovery process of the Ca membrane
channel in myocardial fibers.

Pfluegers Arch. Suppl 347, R 2

KRAUSE, H., ANTONI, H., FLECKENSTEIN, A. (1966)

Ein elektronisches Modell für die Bildung lokaler und fortge-
leiteter Erregungen an der Myokardfaser auf der Grundlage va-
riabler Strom-Spannungs-Kennlinien für K^+ und Na^+ .

Pfluegers Arch. 289, 12-36

LANGER, G.A. (1968)

Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their
relation to myocardial contractility.

Physiol. Rev. 48, 708-757

LANGER, G.A., BRADY, A.J. (1973)

Calcium flux in the mammalian ventricular myocardium.
J. Gen. Physiol. 46, 703-719

LANGER, G.A., SERENA, S.D., NUDD, L.M. (1974)

Cation exchange in heart cell culture: correlation with effects on contractile force.

J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 149-162

LEE, C.O., FOZZARD, H.L. (1974)

Activities of potassium and sodium in rabbit heart muscle.
Fedn. Proc. 33, 299

LENDRUM, B., FEINBERG, H., BOYD, E., KATZ, L.N. (1960)

Rhythm effects on contractility of the beating isovolumic left ventricle.

Amer. J. Physiol. 199, 1115-1120 (1960)

LEOTY, C. (1971)

Relations entre les courants ioniques transmembranaires et la contraction du myocarde. Thèse présentée à l'Université de Poitiers.

LEOTY, C., RAYMOND, G. (1972)

Mechanical activity and ionic currents in frog atrial trabeculae.

Pfluegers Arch. 334, 114-128

LING, G., GERARD, R.W. (1949)

The normal membrane potential of frog sartorius fibers.
J. Cell. Comp. Physiol. 34, 383-396

MAKINOSE, M. (1971)

Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles.

FEBS Letters 12, 269-278

MANNHOLD, R. (1977)

Untersuchungen zum kalziumantagonistischen Wirkungsmechanismus und zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil.

Dissertation Universität Düsseldorf.

MANRING, A., HOLLANDER, P.B. (1971)

The interval-strength relationship in mammalian atrium: a calcium exchange model.

Biophys. J. 11, 483-501

MARSH, B.B. (1952)

The effect of ATP on the fibre volume of a muscle homogenate.
Biochim. Biophys. Acta 9, 247-260

MASCHER, D., PEPER, K. (1969)

Two components of inward current in myocardial muscle fibers.
Pfluegers Arch. 307, 190-203

McCANS, J.L., LINDENMAYER, G.E., MUNSON, R.G., EVANS, R.W.,
SCHWARTZ, A. (1974)

A dissociation of positive staircase (Bowditch) from ouabain-
induced positive inotropism. Use of verapamil.
Circulat. Res. 35, 439-447

McGUIGAN, J.A.S. (1974)

Some limitations of the double sucrose gap and its use in a
study of the slow outward current in mammalian ventricular
muscle.

J. Physiol. (Lond.) 240, 775-806

McGUIGAN, J.A.S., BASSINGTHWAIGHTE, J.B. (1974)

Possible relationship between $[Ca]_i$ and P_K in ventricular
muscle.

Experientia 30, 680

McNAUGHTON, P. (1976)

Dependence of plateau potassium currents on Ca.
7th Europ. Congr. Cardiol., Abstract Book I, 140

MEECH, R.W. (1972)

Intracellular calcium injection causes increased potassium
conductance in Aplysia nerve cells.

Comp. Biochem. Physiol. 42A, 493

MEIJLER, F.L., NIEUWENDIJK, E.S., DURRER, D. (1973)

Physiological basis of paired stimulation potentiation.

In: Paired pulse stimulation of the heart. pp. 65-71. Ed.
P.F. Cranefield and B.F. Hoffman. The Rockefeller University
Press: New York.

MORAD, M., TRAUTWEIN, W. (1968)

The effect of the duration of the action potential on contrac-
tion in the mammalian heart muscle.

Pfluegers Arch. 299, 66-82

MORAD, M., OPKAND, R.K. (1971)

Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence
from voltage clamp studies.

J. Physiol. (Lond.) 219, 167-189

MORAD, M., GOLDMAN, Y. (1973)

Excitation-contraction coupling in heart muscle: Membrane con-
trol of development of tension.

Prog. Biophys. Mol. Biol. 27, 257-313

- MÜLLER, P. (1966)
Lokale Kontraktionsauslösung am Herzmuskel.
Helv. Physiol. Acta 24, C 106-C 108.
- MULLINS, L.J., BRINLEY, F.J. (1975)
Sensitivity of calcium efflux from squid axons to changes in membrane potential.
J. Gen. Physiol. 65, 135-152
- NEUMANN, N., LUISADA, A.A. (1966)
Double blind evaluation of orally administered iproveratril in patients with angina pectoris.
Am. J. Med. Sci. 251, 552-556
- NEW, W., TRAUTWEIN, W. (1972a)
Inward membrane currents in mammalian myocardium.
Pfluegers Arch. 334, 1-23
- NEW, W., TRAUTWEIN, W. (1972b)
The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction.
Pfluegers Arch. 334, 24-38
- NIEDERGERKE, R. (1963)
Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart.
J. Physiol. (Lond.) 167, 551-580
- NOBLE, D. (1960)
Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations.
Nature (Lond.) 188, 495-497
- NOBLE, D. (1962)
A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials.
J. Physiol. (Lond.) 160, 317-352
- OCHI, R., TRAUTWEIN, W. (1971)
The dependence of cardiac contraction on depolarization and slow inward current.
Pfluegers Arch. 323, 187-203
- OHMISHI, T., EBASHI, S. (1964)
The velocity of calcium binding of isolated sarcoplasmic reticulum.
J. Biochem. 55, 599-603
- PAGE, S.G. (1965)
Comparison of the fine structure of frog slow and twitch muscle fibres.
J. Cell. Biol. 26, 477-497

- PAGE, E., FOZZARD, H.A. (1973)
Capacitive, resistive and syncytial properties of heart muscle. Ultrastructural and physiological considerations. In: The structure and function of muscle. 2nd ed. Vol. II, part 2, pp. 91-158. Ed. G.H. Bourne. Academic Press, New York-London
- PEACHEY, L.D. (1965)
The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius.
J. Cell. Biol. 25, 209-231
- PODOLSKY, R.J. (1975)
Muscle activation: the current status.
Fed. Proc. 34, 1374-1378
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C., RÜEGG, J.C. (1964)
The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab *Maia squinado* on the internal concentration of free calcium ions.
Biochim. Biophys. Acta 79, 581-591
- POSNER, C.J., BERMAN, D.A. (1967)
A mathematical analysis of the interval-strength relationship in the rat ventricle strip and its modification by fluoroacetate.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 166-177
- REITER, M. (1962)
Die Entstehung von "Nachkontraktionen" im Herzmuskel unter Einwirkung von Calcium und Digitalisglykosiden in Abhängigkeit von der Reizfrequenz.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 242, 497-507
- REUTER, H. (1966)
Strom-Spannungsbeziehungen von Purkinje-Fasern bei verschiedenen extrazellulären Calcium-Konzentrationen und unter Adrenalinwirkung.
Pfluegers Arch. 287, 357-367
- REUTER, H. (1967)
The dependence of slow inward current in Purkinje-fibres on the extracellular calcium-concentration.
J. Physiol. (Lond.) 192 479-492
- REUTER, H. (1973a)
Divalent cations as charge carriers in excitable membranes.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 26, 1-43
- REUTER, H. (1973b)
Time- and voltage-dependent contractile responses in mammalian cardiac muscle.
Eur. J. Cardiol. 1, 177-181

REUTER, H., BEELER, G.W. (1969)
Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibres.
Science 163, 399-401

REUTER, H., SEITZ, N. (1968)
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol. (Lond.) 195, 451-470

RINGER, S. (1883)
A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart.
J. Physiol. (Lond.) 4, 29-42

ROSENBLUETH, A., ALANIS, J., PUBIO, R. (1959)
Some properties of the mammalian ventricular muscle.
Arch. Int. Physiol. 67, 276-293

ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUIL, J.M., CORA-BOEUF, E. (1969)
Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential.
Pfluegers Arch. 308, 91-110

RUMBERGER, E., REICHEL, H. (1972)
The force-frequency relationship: a comparative study between warm- and cold-blooded animals.
Pfluegers Arch. 332, 206-217

SANDLER, G., CLAYTON, G.S., THORNICROFT, S.G. (1968)
Clinical evaluation of verapamil in angina pectoris.
Br. Med. J. 3, 224-227

SCHAEFER, J., VAN ZWIETEN, P.A. (1971)
I. Quantitative studies on the time course of changes in contractile force provoked by changes in heart rate.
II. Influence of noradrenaline and hexobarbital-Na.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 79, 727-741

SCHNEIDER, M.F., CHANDLER, W.K. (1973)
Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling.
Nature (Lond.) 242, 244-246

SILVA GRAÇA, A., VAN ZWIETEN, P.A. (1971)
The influence of iproveratril on calcium movements in isolated heart muscle.
Eur. J. Pharmacol. 15, 137-140

SIMPSON, F.O., RAYNS, D.G. (1968)
The relationship between the transverse tubular system and other tubules at the Z disc levels of myocardial cells in the ferret.
Am. J. Anat. 122, 193-208

SIMURDA, J., SIMURDOVA, M., BRAVENY, P., SUMBERA, J. (1976)
Slow inward current and action potentials of papillary muscles
under non-steady state conditions.
Pfluegers Arch. 362, 209-218

SOLARO, R.J., BRIGGS, N.F. (1974)
Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic re-
ticulum in cardiac muscle. Calcium binding.
Circ. Res. 34, 531-540

SOMMER, J.R., JOHNSON, E.A. (1968)
Cardiac muscle: a comparative study of Purkinje fibers and
ventricular fibers.
J. Cell. Biol. 36, 497-526

STRICHARTZ, G.R. (1973)
The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by
quaternary derivatives of lidocaine.
J. Gen. Physiol. 62, 37-57

TRAUTWEIN, W., McDONALD, T.F., TRIPATHI, O. (1975)
Calcium conductance and tension in mammalian ventricular
muscle.
Pfluegers Arch. 354, 55-74

TRITTHART, H., KAUFMANN, R., VOLKMER, H.P., BAYER, R., KPAUSE, H. (1973)
Ca-movement controlling myocardial contractility I. Voltage-,
current- and time-dependence of mechanical activity under
voltage clamp conditions (cat papillary muscles and trabeculae).
Pfluegers Arch. 338, 207-231

VAUGHAN WILLIAMS, E.M. (1959)
Simultaneous measurements of contractions and intracellular
potentials in isolated rabbit atria exposed to acetylcholine.
J. Physiol. (Lond.) 147, 325

VITEK, M., TRAUTWEIN, W. (1971)
Slow inward current and action potential in cardiac Purkinje
fibres.
Pfluegers Arch. 323 204-218

WALKER, S.M., SCHRODT, G.R., EDGE, M.B. (1970)
Electron-dense material within sarcoplasmic reticulum apposed
to transverse tubulus and to the sarcolemma in dog papillary
muscle fibers.
Am. J. Anat. 128, 33-44

WEBER, A. (1968)
The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic re-
ticulum.
J. Gen. Physiol. 52, 760-772

WEBER, A. (1971a)

Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum I. The effect of accumulated calcium on transport and adenosine triphosphate hydrolysis. J. Gen. Physiol. 57, 50-63

WEBER, A. (1971b)

Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum II. Inhibition of outflux in calcium-free media. J. Gen. Physiol. 57, 64-78

WEBER, A., HERZ, R. (1968)

The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. J. Gen. Physiol. 52, 750-759

WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1963)

On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 46, 679-702

WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1966)

Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. Eur. J. Biochem. 345, 329-369

WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1967)

The nature of the cardiac relaxing factor. Biochim. Biophys. Acta 131, 188-194

WEIDMANN, S. (1955)

The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium carrying system. J. Physiol. (Lond.) 127, 213-224

WINEGRAD, S. (1961)

The possible role of calcium in excitation-contraction coupling of heart muscle. Circulation 24, 523-529

WINEGRAD, S. (1965)

Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 48 455-479

WINEGRAD, S. (1968)

Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus. J. Gen. Physiol. 51, 65-83

WINEGRAD, S. (1970)

The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle.

J. Gen. Physiol. 55, 77-88

WINEGRAD, S., SHANES, A.M. (1962)

Calcium flux and contractility in guinea pig atria.

J. Gen. Physiol. 45, 371-394

WOOD, E.H., HEPPNER, R.L., WEIDMANN, S. (1969)

Inotropic effects of electric currents. I. Positive and negative effects of constant electric currents or current pulses applied during cardiac action potentials. II. Hypothesis: calcium movements, excitation-contraction coupling and inotropic effects.

Circ. Res. 24, 409-445

